

ÜBER DIE ISOLIERUNG NIEDERMOLEKULARER SUBSTANZEN
(MG 500-10000) AUS DEM KALBSMYOKARD
UND DEREN WIRKUNG
AUF DEN KREISLAUF DES KANINCHENS

Karl Einhäupl

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551925_0073

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. med. N. Zöllner

ÜBER DIE ISOLIERUNG NIEDERMOLEKULARER SUBSTANZEN
(MG 500-10 000) AUS DEM KALBSMYOKARD
UND DEREN WIRKUNG AUF DEN KREISLAUF DES KANINCHENS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Karl Einhüpl

aus München

München 1975



Mit Genehmigung des Medizinischen Fachbereiches
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Nowy
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 1975

Ich danke Herrn Prof. Dr. NOWY für die Überlassung
des Themas und seine freundliche Unterstützung bei
der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Krülle, deren große
Erfahrung sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen
hat.

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methode	2
I. Herstellung eines Kalbsherzextraktes	2
1. Entnahme des Herzens	2
2. Präparation und Aufbewahrung	2
3. Homogenisierung	3
4. Extraktion.	3
5. Zentrifugierung	3
6. Ultrazentrifugierung	3
II. Trennung in Molekulargewichtsklassen.	3
1. Ultrafiltration	3
2. Gelchromatographie	4
III. Tierversuche.	6
1. die Versuchstiere.	6
2. Narkose und OP-Vorbereitung	6
3. Präparation.	6
4. Versuchsanordnung und Geräte	7
5. Versuchsdurchführung.	7
IV. Auswertung der Aufzeichnungen	9
C. Ergebnisse	10
I. Substratherstellung.	10
II. Tierversuche.	11
D. Diskussion	18
I. Methode	18
II. Ergebnisse	21
E. Zusammenfassung	24
F. Literaturverzeichnis.	27
G. Anhang.	29

A. Einleitung

Beim Zerfall von Gewebe wird aus den dabei zugrunde gehenden Zellen eine Vielzahl von Stoffen frei, die entweder am Ort ihrer Freisetzung oder an anderer Stelle im Organismus ihre biologische Wirkung entfalten. Mittlerer gelangen auch physikalische oder unphysiologische Reize, die zwar nicht die Zerstörung der Zelle bewirken, jedoch die Freisetzung wirksamer Substanzen herbeiführen.

Ein klassisches Beispiel für ein solches Geschehen ist die Freisetzung von Histamin (8) aus Mastzellen. Aus menschlichem Gewebe konnte durch verschiedene Isolier- und Aufschlüsselungsverfahren eine Reihe von charakteristischen Substanzen isoliert werden, die ihre, zum Teil noch ungeklärte biologische Aktivität entfalten.

Weitgehend untersucht ist die Wirkung der Kinine, Bradikinin und Kallidin (27). WOLLHEIM (41) gelang es, aus dem Harn gesunder Personen ein Peptidgemisch zu isolieren, das im Urin essentieller Hypertoniker fehlt. Ein anderes Peptid fand LEFER im Plasma von Hunden, die sich im cardiogenen Schock befanden (16).

Die Frage, inwieweit auch im menschlichen Gewebe, wie im Hypothalamus zum Beispiel, auch im Herzmuskelgewebe Substanzen enthalten sein könnten, deren akute Freisetzung z.B. infolge Gewebszerfalls (Infarkt) eine biologische Wirkung z.B. am Kreislaufsystem hervorruft. Jener Vorgang also, der zur Freisetzung sog. Indikatorenzyme (GOT, LDH) führt, könnte auch evtl. vorhandene kreislaufwirksame Substanzen in die Zirkulation einschleusen.

Wir isolierten daher aus dem Homogenat von Kalbsherzen Stoffe, die entsprechend ihrem Molekulargewicht unter anderem als Peptide angesehen werden können. Eine weitere Aufschlüsselung bleibt späteren Untersuchungen vorbehalten. Im akuten Versuch testeten wir ihre Wirksamkeit auf den Kreislauf des Kaninchens durch Aufzeichnung des arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz.

B. Methode

I. Herstellung eines Kalbsherzextraktes

1. Entnahme des Herzens

Für die Durchführung der Versuche nötige Menge des Extraktes waren 4 Kalbsherzen als Ausgangsmaterials notwendig. Die Tiere wurden im Schlachthof München mit einem Schußapparat getötet. Die Zeit vom Schuß bis zur Entnahme des Herzens dauerte bei keinem der Tiere länger als 5 Minuten. Nachdem wir das entnommene Herz grob von Bindegewebe, Gefäßen und Lunge freipräpariert hatten banden wir einen Gummischlauch in den am Herzen stehengebliebenen Aortenstumpf etwas oberhalb der Aortenklappe ein und spülten durch ihn die Koronargefäße mit einer vorher auf 37°C erwärmten Kochsalzlösung solange, bis aus dem venösen Schenkel eine klar erscheinende Flüssigkeit abfloß. Das Einbinden des Gummischlauches geschah in einem Bad mit physiologischer Kochsalzlösung, um das Eindringen der Luft in die Koronargefäße zu vermeiden. Das entblutete Herz wurde mit flüssigem Stickstoff (-196°C) übergossen und anschließend in Trockeneis (-80°C) gelagert. Von der Entnahme der Herzen aus dem getöteten Kalb bis zum Einfrieren in flüssigen Stickstoff vergingen in keinem Fall mehr als 10 Minuten.

2. Präparation und Aufbewahrung

Wir begannen nun mit dem Abpräparieren von Gefäßen, Fettgewebe und bindegewebigen Strukturen. Dabei tauten wir die Herzen nicht vollständig auf, sondern brachten sie lediglich in einen Zustand, der uns die Präparation erlaubte. In diesem Zustand trennten wir das Vorhof- vom Kammergewebe. Bei einer Temperatur von 0°C zerkleinerten wir getrennt Vorhof und Kammergewebe um es anschließend zu wiegen. Das Vorhofgewebe wurde zur weiteren Verwendung eingefroren.

Herz Nr.	Entnahme	Kammergewicht	Vorhofgewicht	aqua bid.
I	16.11.71	587,5g	84g	1175 ml
II	16.11.71	515 g	87g	1030 ml
III	23.11.71			
IV	23.11.71	953 g	130g	1906 ml

3. Homogenisierung

Das auf diese Weise zerkleinerte Kammerewebe wurde mit 2 Teilen Aqua Bidest versetzt und in einem Homogenisator der Fa. E. Bühler, Tübingen (7000 U/Min.) 1-3 Minuten bei 0°C homogenisiert.

4. Extraktion

Das Homogenat brachten wir in einen Kühlschrank um es 24 Stunden bei 8°C mit einem elektrischen Rührer durchzurühren.

5. Zentrifugierung

Das nun vorliegende Material zentrifugierten wir bei 3000g und 0°C 20 Minuten in einer Zentrifuge der Fa. Christ, Osterode Typ 2 KS. Der Überstand wurde gesammelt, das Sediment mit 200 ml Aqua Bidest aufgeschwemmt und nochmal 10 Minuten bei 3000g zentrifugiert.

6. Ultrazentrifugierung

Mit einer Beckmann-Ultrazentrifuge L2 Rotor 30 zentrifugierten wir 3 Stunden bei 50000 U/Min. den Überstand der beiden Zentrifugationen in der Christ-Zentrifuge. Wie bereits bei jenem Arbeitsgang verwarfen wir auch diesmal das Sediment. Den Überstand der Ultrazentrifugation lyophilisierten wir mittels eines Trockensystems aus Äthanol das wir gut mit Öl-Öl beschütteln. Das Material bewahrten wir bei -20°C auf.

II. Trennung in Stoffgemische verschiedener Molekulargewichtsklassen

1. Ultrafiltration

Um die Bestandteile mit einem Molekulargewicht von mehr als 3000 abzutrennen verwendeten wir Ultrafilter der Fa. LKB Produkter AB Stockholm. Diese bestehen aus nahtloser Zellulose LKB 63 007, deren Porengröße 10000-20000 Å beträgt.

zogen. Durch Vorvakuumung wurde der Schlauch an seinem inneren Pol verschlossen. Diese so überzogenen Körbe stellten wir in eine 3%ige Lösung des lyophilisierten Materials in Aqua dest. Mit einer Wasserstrahlpumpe erzeugten wir ein Vakuum im Inneren des Korbes und beschleunigten somit den Filtrationsvorgang, den wir im Hochbad durchführten. Während Material mit einem Molekulargewicht von mehr als 30 000, das in der Lösung zurückblieb, anderweitig Verwendung fand, lyophilisierten wir das Filtrat in dem sich Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 30 000 befanden.

Das Lyophilisat wurde mit 5%iger Aqua bidest-Lösung versetzt und weiter mit Dialysemembran-Filtern (AMICON BV, Oosterhout, Holland) aufgetrennt.

Resultat der Ultrafiltration (Gewichte im gefriergetrockneten Zustand)

Filter	Molekulargewicht	Menge	Bezeichnung
LKB 6390-1	30 000 - größer	18,2 g	
PM 10	10 000 - 30 000	10,76 g	K A
Um 2	1 000 - 10 000	0,06 g	K B
Um 0,5	500 - 1 000	0,476 g	K C
Rest	1 - 500	9,233 g	K D

(die Bezeichnung K bedeutet Kalb, die Bezeichnung A-D gibt die 4 Molekulargewichtsklassen an)

Die in der Tabelle mit A-D bezeichneten Fraktionen wurden nach der Ultrafiltration wieder lyophilisiert und bei -20°C aufbewahrt.

Während die Fraktionen KA und KD in anderen Untersuchungen (14) weiterverarbeitet wurden, wandten wir uns den Substanzen mit einem MG von 500-10 000 (KB und KC) zu.

2. Gelfiltration

Um die Fraktionen B und C weiter aufzutrennen, bedienten wir uns der Säulengelfiltrationsmethode. Wir verwendeten eine 100 mm hohe Säule, die einen Innendurchmesser von 3 cm hatte (Säule LKB 6390). Die Säule war ständig von Kühlwasser umspült, das im ständigen Umlauf durch einen Tauchkühler auf einer Temperatur von 8°C gehalten wurde. (Kolora Tauchkühler TK 64, Kolora Umlaufpumpe mit Regelheizung).

Die Säule selbst wurde mit Sephadex G 100 gepackt. Das Gels hat eine Korngröße von 40-120, ein Wasseraufnahmevermögen von $1,0 \pm 0,1$ ml/g. Wir eluierten mit deionisiertem Wasser (Muldestor), das wir zuvor evakuierten. Bei der Auftrennung der Fraktion KA versuchte SCHMIED (32), die Stromstärke des Elutionsmittels mit einer Mariotteschen Flasche konstant zu halten. Bei den Fraktionen KB und KC stellten wir den Versuchsaufbau in der Weise um, daß wir den Vorlauf des Elutionsmittels mit einer Schlauchpumpe regelten. Nach verlassen der Säule registrierte eine Fotozelle, die mit der Wellenlänge $254 \text{ m}\mu$ arbeitete, die Transmission. (Uvicord LKB 4001 A). Der Auslauf wurde in Reagenzglasern aufgefangen, die von einem Fraktionssummler 1,2 stündlich weiterbewegt wurden (LKB 3400 B). Die Transmission zeichneten wir mit einem Fallbügelschreiber (LKB 6520 A) auf. Bevor wir die Fraktionen zur Auftrennung in die Säule einbrachten, stellten wir von der Fraktion B eine 40%ige, von jeder Fraktion C eine 10%ige Lösung (mit Muldestor) her, die 10 Min. bei $4 \pm 1^\circ \text{C}$ Min. und 1000 U zentrifugiert wurde, um etwaige unlösliche Bestandteile zu entfernen. Um die Absenkung zu beschleunigen, versetzten wir die Lösung mit einer Spatelspitze Saccharose (Mol. Gew. 342,3) womit wir das spezifische Gewicht der Lösung erhöhten. Vom so zubereiteten Substrat ließen wir 1,5-4,7 ml mit einer Kanüle vorsichtig auf die Geloberfläche auflaufen. Wir achteten dabei darauf, daß die Geloberfläche nicht aufgewirbelt wurde.

Name	Menge	Konz. muld.	Molekulargewicht
KB	1,5 ml	4% ig	MG 10000 - 1000
KC I	4,7 ml	10% ig	MG 1000 - 500
KC II	1 ml	10% ig	MG 1000 - 500
KC III	1 ml	10% ig	MG 1000 - 500

Das Ergebnis dieser Auftrennung waren Eluate, die in 30 Min. ausströmen und von uns mit arabischen Ziffern durchnummeriert wurden. Es entstand so z.B. die Fraktion KC I-1-36. Das Eluat des nächsten ml bekam die Bezeichnung KC II. Etwa alle 4-6 Stunden entnahmen wir die gefüllten Reagenzgläser dem Fraktionssummler und bewahrten sie bei 8°C auf, bis die gesamte aufgetragene Probe durchgeflossen war. Im Anschluß daran (maximum 2 Stunden) schüttelten wir vorsichtig auf, bis sich das Substrat gemäß den in der Transmissionsaufnahme getriebenen Teilchen wieder verteilt

dem wir zuvor stichprobenartig das Volumen der Ansäufte gemessen hatten. Diese Gemengen wurden nun getriegetrocknet und im Kühlschrank bei -10°C aufbewahrt. Nachdem alle aus der Ultrafiltration gewonnenen Fraktionen KB-KC gelochromatographiert waren, verglichen wir die Transmissionskurven der verschiedenen Proben (I-III) einer Fraktion (z.B. KC). Die begründeten Gruppen vereinigten wir und trockneten sie wieder. Im getriegetrockneten Zustand wogen wir nun die so erhaltenen Substanzen und lösten sie in 1 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung. Dies war das Ausgangsmaterial für unsere Versuche.

III. Tierversuche mit Kaninchen

1. die Versuchstiere

Zur Versuchsdurchführung verwendeten wir Kaninchen. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 2040g und 3740g. Die Tiere entstammten alle dem Versuchstierstall der Medizinischen Poliklinik und wurden von uns vor Beginn des Versuches groß inspiiziert. Wenn sich bei diesen Untersuchungen kein Anhalt für eine Erkrankung des Tieres ergab, wurde es von uns für den Versuch zur Verfügung gestellt. Wir verwendeten sowohl männliche als auch weibliche Tiere.

2. Narkose und OP-Vorbereitung

Nachdem das Tier gewogen war, narkotisierten wir es mit einer 2%igen Urethanlösung, die wir in eine Ohrvene injizierten. Die verwendete Menge schwankte stark zwischen 1,7 und 3,0 ml/kg Körpergewicht. Als Maß für die von uns angestrebte Narkosetiefe wählten wir den Corneal-Reflex. War er nicht mehr auslösbar, beendeten wir die Injektion.

3. Präparation

Das verunesthetisierte Tier wurde nun auf einem Präparationstisch (Fa. Braun Melsungen, Typ 0701) befestigt, indem es mit dem Bauch nach oben liegend im Genick leicht überstreckt, an den 4 Extremitäten eingeschnitten wurde. Mit einem ca. 3 cm langen Hautschnitt an der Medianlinie, der wir zwischen Scapula und Larynx plazierten, streifen wir die Schürung durch die wir lateral des linken Sternokleidomastoideus

Die Verabreichung des antithrombotischen Wirkstoffes nach ca. 300 min nachgewiesener Thrombozytopenie auf der rechten Seite war mit 100 mg Heparin (Bayer) verbunden. Infolge der Art der Lagerung (Lagerung auf 10°C) kam es zur Vermehrung von *S. aureus* (Vergleich mit dem positiven Kontrollversuch). Der Patient war in der Folge tageweise mit Penicillin (No. 1) und Heparin (ca. 100 mg) behandelt. Das bei der Infektion mit *Staphylococcus aureus* injizierte wir durch diese Brauntile sofort ca. 40 mg Heparin in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (entsprechend 1000 U) über einen in die Peripherie der Extremität eingelegten Katheter verabreicht. Infolge der Infektion mit *S. aureus* wurde das Gefäß ab und ab mit 100 mg Heparin in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (entsprechend 1000 U) über einen in die Peripherie der Extremität eingelegten Katheter verabreicht. Zwischen dieser letzten Heparinverabreichung und dem Absterben des Patienten lag ein Zeitraum von ca. 10 Tagen. Infolge der Infektion mit *S. aureus* wurde das Gefäß ab und ab mit 100 mg Heparin in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (entsprechend 1000 U) über einen in die Peripherie der Extremität eingelegten Katheter verabreicht. Infolge der Infektion mit *S. aureus* wurde das Gefäß ab und ab mit 100 mg Heparin in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (entsprechend 1000 U) über einen in die Peripherie der Extremität eingelegten Katheter verabreicht.

4. Versuchsanordnung

Die in die A. Carotis eingebrachte Kanüle wurde mit einem Statham Druckwandler verbunden (Statham physiological pressure transducer Nr. P 23 AA). Die Kammer vor der Drucknehmermembran füllten wir luftblasenfrei mit physiol. NaCl Lösung, um eine Dämpfung der Druckkurve zu vermeiden. Über einen Röhrensender und einen Verstärker (E. A. M. Electronics) ließen wir die Druckkurven an einem Drehspulinstrument ablesen. Durch Umschaltung des Meßbereichs konnten wir die für die Drucke des Tieres optimalen Versuchsbedingungen schaffen. Neben dem Druck in der A. Carotis leiteten wir die 3 Standardableitungen nach Einthoven mit Nadelelektroden ab. Beide Signale, Druck und EKG gaben wir einerseits auf einen Atlas-Mehrfachschreiber (EM 43 A) und andererseits auf einen Oszillographen, der uns bereits während des Versuches eine Ablesung erlaubte. Durch Variation des Papiervorschubes von 10, 50, 25 und 100 mm/sec. war eine Spreizung der Aufzeichnung möglich. Die Aufzeichnung erfolgte auf einem 100 x 20 cm großen Oszillographen (Intensitron semimatt T 11 100 x 20). Ein Synchronmotor blendete Zeitmarken in einem Abstand von 20 msec ein.

5. Durchführung der Versuche

und der Carotiskanüle genau in die Höhe des Ausganges der Meßkammer brachten und dabei aufzeichneten. Gleichzeitig eichten wir mit einem Impuls, der 20 mm Hg entsprach. Nun zeichneten wir erstmals Druck und EKG mit einem Bandvorschub von 50 bzw. 25 mm/sec auf. Die Lichtstärke des Atlasgerätes reichte jedoch nicht aus, um verwertbare Aufzeichnungen zu erhalten. Wir zeichneten daher bei allen folgenden Versuchen mit einem Bandvorschub von 50 mm/sec während der Injektion und 50 und 100 mm/sec bei allen folgenden postinjektiven Aufzeichnungen auf. Dies waren Werte bei 1, 2, 3, 4, 5, 10 und ggf. 15, 20, 25 Min. und länger. Stellten wir auf dem Monitor zwischen den Minutenintervallen Veränderungen fest, zeichneten wir auch diese auf.

Bei jedem Versuch zeichneten wir bereits einige Schläge vor Beginn der Injektion auf, injizierten dann 1-2 ml der vorbereiteten Lösung in einer Zeit von 0,8-2 sec – was wir durch Betätigung der Eichaste des EKGs kennzeichneten – schrieben noch etwa 10 sec mit 50 mm/sec und schrieben dann nochmals ca 10 sec mit 100 mm/sec. Nach Beendigung der 10-Minuten-Aufzeichnung begannen wir entweder mit dem nächsten Versuch oder warteten nochmal bis zu 10 Min., wenn die Werte noch auffallend weit von den vor der Injektion gemessenen Werten entfernt waren. Zu Beginn der Versuchsserie nahmen wir vor jedem Versuch eine Eichung vor. Da wir jedoch feststellten, daß die Druckschreibung relativ stabil war, unterließen wir dies später, um zu hohe Blutverluste beim Auftrennen des Verbindungsstückes zwischen Kanüle und Druckmeßgerät zu vermeiden. Die Versuche, die wir an einem Tier durchführten, dauerten zwischen 3 und 5 Stunden. Berücksichtigt man die Präparationszeit von maximal 1,5 Stunden, so wurde kein Tier länger als 6,5 Stunden zur Testung des Materials verwendet.

Um Temperatureffekte der Injektion besser erfassen zu können, inkubierten wir bei einer Versuchsserie die Lösungen auf 37°C.

Als Kontrolltier verwendeten wir ein Kaninchen, das den selben Bedingungen wie die übrigen Tiere unterlag. Wir injizierten 1-2 ml inkubierte oder nichtinkubierte NaCl-Lösung (0,9%). Die Variation des injizierten Volumens sollte uns Aufschluß über etwaige Volumeneffekte geben.

IV. Auswertung

Auswertung der Aufzeichnung.

Den systolischen und diastolischen Druck übertrugen wir maßstabgetreu auf ein mm-Papier. Bei den Minutenwerten mittelten wir die Drücke mehrerer Atemzyklen, wobei wir jeweils die Werte von der Inspiration bis zur Expiration oder umgekehrt verwendeten. Die Frequenz schrieben wir als Intervalldauer, wobei wir ebenso wie bei den Drücken verfahren. Auch mittelten wir die Minutenwerte. Die Mitteldrucke ergaben sich rechnerisch aus der direkten Druckaufzeichnung.

Um ein Maß für die Inotropie des Herzens zu haben, errechneten wir Veränderungen im $tg\ \alpha$ des arteriellen Blutdruckes. Da die Anstiegssteilheit mit der Atmung ebenfalls variiert, suchten wir den steilsten $tg\ \alpha$ aus einem mit 100 mm/sec geschriebenen Aufzeichnungsintervall. Die Auswertung erfolgte graphisch durch Anlegen einer Geraden. Da jedoch schon beim Ablesen eine Fehlerbreite von 40% entsteht, verzichteten wir auf die Interpretation dieses Parameters.

C. Ergebnisse

I. Substratherstellung

Der letzte Schritt vor Beginn der Tierversuche war die Auftrennung des bereits vorfractionierten Materials in jene Fraktionen, die später den Versuchstieren injiziert wurden. Wir bedienten uns dazu der Säurechromatographie. Das aufzutrennende Material war das Ergebnis der Ultrafiltration, also die Fraktionen KA, KB, KC, KD. Während die Fraktionen KA und KD von anderen Untersuchern (32) weiterverarbeitet wurden, beschäftigten wir uns im folgenden mit den Fraktionen KB und KC. Die Menge von KB (Molekulargewicht $1000 \cdot 10^{-6}$) betrug 0,06 g, die von KC (Molekulargewicht 500-1000) betrug 0,476 g.

Die auf Millimeterpapier übertragenen Auslaufkurven sind in den Abbildungen 1-4 dargestellt. KB: (Abb. 1, siehe Anhang)

Der quantitativ größte Teil des Substanzgemisches KD erscheint in den Fraktionen 17-27. Dies entspricht einer Elution von ca. 240-340 ml. In diesem Peak sind vermutlich alle Substanzen über Molekulargewicht 1000 enthalten. Diesem ersten, großen Peak folgen noch mehrere ineinander übergehende. Auf der Auslaufkurve stellt sich dies als langsam gegen x verlaufende, annähernd Gerade dar. Etwa in Fraktion 77 beginnt ein Substanzgemisch auszulaufen, das bei Fraktion 100 seinen Höhepunkt und bei 80 wieder die Basis erreicht hat. KC: (Abb. 2-4, siehe Anhang)

Im folgenden wurde der Rückstand aus der Ultrafiltration mit UM 0,5 in drei gleich großen Portionen chromatographiert. Bei grober Betrachtungsweise ähneln sich - wie zu erwarten - die Auslaufkurven. Bei KC I erscheint vor dem ersten großen Peak, etwa in Fraktion 17 ein minimaler Gipfel, der in den Fraktionen KC II und KC III nicht zu sehen ist. Während in KC I und KC III vor Erreichen des punctum maximum eine deutliche Einkerbung zu sehen ist, kommt bei KC II im Bereich der Fraktion 24 lediglich zu einer Verminderung der Steigung. Die in KC I im absteigenden Schenkel des ersten großen Peaks dargestellte Einkerbung - etwa bei Fraktion 26 - weist in KC II lediglich eine Transmission von ca. 20% auf. In KC III steigt sie auf: in KC I bei einer Transmission zwischen 10 und 30%, stellt sich in KC II noch mehr als Einkerbung - sondern als veränderte Steigung dar. In der Fraktion 30-35 sind mehrere, häufig über Transmission ineinander über-

gehende Fraktionen, besonders in KC 1 kommt es zu Fraktionen, die zu einer bestimmten Transmittanzkurve führen. Der im Bereich von Fraktionen 18 liegende Peak kommt in KC 1 am deutlichsten und in KC 11 am wenigsten deutlich zur Darstellung. Ein kleiner, deutlicher Peak kommt in den Fraktionen um 80 zum Auslauf.

II. Tierversuche

Die 1te Aufstellung in Fraktionen durch den halbstündlich wechselnden Fraktionssammler bezüglich der in den Fraktionen enthaltenen Substanzgemische obnein wirksam war und wir bei der Verabreichung des zu untersuchenden Materials eine minimale Wirkdosis anstellen lassen, vereinigten wir mehrere Fraktionen. Bei dem Substanzgemisch 11 beschränkten wir diese Vereinigung auf jene Teile des Auslaufs, die eine geringe Extinktion aufwiesen. Im Bereich der Peaks injizierten wir die Fraktionen einzeln.

Bei dem Substanzgemisch KC 11 saßen wir nicht nur im Auslauf aufeinanderfolgende Fraktionen vereinigen, sondern auch die kongruenten Fraktionen der 3 Portionen wieder zusammenfassen. Dabei richteten wir uns in erster Linie nach dem optischen Bild, also den Peaks auf den Auslaufkurven und nicht so sehr nach den Elutionsvolumina. Wie bei dem Substanzgemisch K1 injizierten wir auch bei KC die Fraktionen im Bereich der Peaks einzeln, während wir die Fraktionen im Bereich geringer Extinktion zusammenfaßten.

Die Tierversuche wurden mit laufenden Nummern versehen. In Tabelle 2 ist bei den entsprechenden Tierversuchen der Inhalt des injizierten Substanzgemisches angegeben.

Aus praktischen Gründen wurden die auf mehrerhundert Millimetern angegebenen Parameter in einer Millimeterpapierzeichnung gefaßt. Auf der ersten Seite der Zeichnung angegeben. Während kurz vor dem Einspritzen der Infektionsschleife (1) markiert wurde, wurde in der Regel nach 1 Minute, 2, 3, 4, 5 und 10 Minuten ein Kontinuum zwischen 2 Atemzyklen registriert. Aus den festgehaltenen Werten wurde ein Mittelwert gebildet, der auf dem Millimeterpapier wiedergegeben ist.

Die extreme Spitze auf der Auslaufkurve und die auf der Ableitungskurve des Kontinuums bei 10 Minuten ist auch kontinuierlich und Ableitungskurve (2) gegeben.

inen senkrechten Strich verbunden. Die zweite Spalte gibt die Intervalldauer zwischen zwei Herzschlägen an. Auch hier wurde zunächst kontinuierlich und dann diskontinuierlich aufgezeichnet. Die Intervalldauer stellt somit den reziproken Wert der Frequenz dar $I = (1/P)$. Die oberste Spalte zeigt das Verhalten des arteriellen Mitteldruckes. Er wurde nur für die Zeit der diskontinuierlichen Messung angegeben. Lücken in den Kurven oder gar fehlende Aufzeichnungen haben ihre Ursache in technischen Mängeln bei der Versuchsdurchführung.

Um zu differenzieren, ob ein Effekt durch die in der Injektion enthaltene Substanz oder durch Volumen, Temperatur oder andere Faktoren bedingt ist, präparierten wir ein Kaninchen in der selben Weise wie die übrigen Versuchstiere und führten bei auch sonst gleicher Versuchsanordnung die selbe Anzahl von Placeboversuchen aus. Der einzige Unterschied zu den übrigen Versuchen bestand darin, daß bei den sog. Blindversuchen nur Natriumchlorid ohne enthaltene Substanz injiziert wurde. Wir verabreichten den Tieren insgesamt 5 Injektionen reinen Natriumchlorids in physiologischer Konzentration. Dies erscheint um so mehr gerechtfertigt, als wir auch das Lyophilisat der bei der Gelchromatographie gewonnenen Fraktionen in physiologischer NaCl auflösten.

Kontrolltier:

Unmittelbar post Injektionem stiegen systolischer und diastolischer Blutdruck um ca. 18% des Ausgangsdrucks an. Sofort nach dieser Druckerhöhung, die nur einige Schläge anhielt, kam es zu einem geringfügigen Absinken des Druckes gegenüber dem Ausgangsdruck. Dieser war jedoch nach spätestens 1 Minute wieder annäherungsweise erreicht. Während bei der 1., 2. und 3. Injektion diese negative Nachschwankung stets vorhanden war, fehlt sie bei Injektion 4. und 5. Bei Injektion 4 und 5 ist jedoch auch der Anstieg des systolischen und diastolischen Blutdrucks nur wenig ausgeprägt.

Das Gesamtdruckverhalten des Tieres zeigt während des gesamten Versuches eine fallende Tendenz (siehe arterieller Mitteldruck). Der systolische Blutdruck nahm von Versuchsbeginn bis zu Versuchsende um 14%, der diastolische um 12% ab. Die Änderung der Herzfrequenz, die wir als Intervalländerung aufzeichneten, kann kaum gewertet werden. Lediglich nach der 1. NaCl Injektion kommt zu einem ge-

ringgradigen Absinken der Frequenz. Dieser Anstieg der Intervalldauer liegt jedoch im Bereich der Ableseungenauigkeit.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß es während der gesamten Versuchsdauer zu einem nicht substanzbedingten kontinuierlichen Druckabfall kommt. Die Injektion von 1-2 ml Natriumchlorid führt zu einem Anstieg beider Blutdruckwerte, der einige Schläge dauert, um anschließend — eine negative Nachschwankung durchlaufend — wieder den Ausgangsdruck vor Injektion zu erreichen. Dieses ebenfalls nicht substanzbedingte Verhalten des Blutdruckes nimmt gegen Ende des Gesamtversuches ab.

Die Frequenz erfuhr während des gesamten Versuchs keine nennenswerte Veränderung. Ebenso hatte die Veränderung der Temperatur der injizierten Lösung keinerlei Effekte zur Folge. Auch SCHMID (33) kam in ihrer Versuchsreihe zu diesem Ergebnis.

Versuch 10

Bereits vor der Injektion ein leichter Druckabfall. Die Druckwerte während und nach der Injektion zeigen im Verhältnis dazu keine besonderen Veränderungen. Allerdings liegen die Minutenwerte gegenüber den post-Injektionswerten um 5/8% höher.

Das Intervall nimmt von post-Injektionem bis zur 4. Minute um 6% ab, und steigt zur 5. Minute auf den post-Injektionswert an. Von hier aus fällt es bis zur 20. Minute um 9% ab.

Versuch 11/1

In der post-Injektionsphase ein Druckabfall um 1/14', mit Normalisierung bis zur 1. Minute, Frequenz nicht ablesbar (Defekt am Schreiber) Verlauf ansonsten unauffällig.

Versuch 11/2

Wie im Versuch 11/1 ist in der post-Injektionsphase ein Druckabfall von ca. 7% zu registrieren, der jedoch nur einige Schläge dauert. Danach sofortige Normalisierung.

In der 20. Minute ein Abfall bis 20/14', mit sofortiger Normalisierung bis der 21. Minute.

In der Mitte des Versuches kommt es zu einem Abfall der Intervalldauer von $2,14\%$, begleitet von einem minimalen Druckabfall. Beide Werte haben in der 4. Minute wieder ihr Ausgangsniveau erreicht.

Versuch 12

Zu Beginn der Injektion zeigt sich ein geringgradiger Druckanstieg, der jedoch schon zum Ende der Injektion nach Durchlaufen des Ausgangswertes in eine geringgradige Druckerhöhung übergeht. Vollige Normalisierung noch in der post-Injektionsphase. Keine Veränderung im Bereich der Minutenwerte. Die Frequenz verhält sich unauffällig.

Versuch 13

Während des gesamten Versuches kommt es zu keiner nennenswerten Druck- oder Frequenzveränderung. Unmittelbar nach Beendigung der Injektion kommt es zu einem geringgradigen Anstieg des Druckes, der jedoch bereits in der post-Injektionsphase seinen Ausgangswert wieder erreicht.

Versuch 14

Schon zu Beginn der Injektion steigt der Druck leicht an ($0,4/1,3\%$). Nach der Injektion ist ein deutlicher Abfall zu verzeichnen ($16,1/17,3\%$), der sofort wieder bis fast zur Ausgangslage zurückkehrt. Noch in der post-Injektionsphase steigt der Druck um $7,5/6,6\%$ an und hält dieses Niveau in der 1. und 2. Minute. Der 3. Minutenwert liegt wieder unter dem Ausgangsdruck ($4,3/6,6\%$) und steigt bis zur 4. Minute auf den höchsten Punkt des Versuches ($10,7/9,3\%$).

Die Intervalldauer erfährt während des ganzen Versuches keine nennenswerte Änderung.

Versuch 15

In der Mitte der Injektion beginnt ein leichter Druckanstieg ($6,0/1,3\%$) bis zum post-Injektionswert von $8,1/9,1\%$ des Ausgangswertes. Dieser wird jedoch noch innerhalb der 1. Minute wieder erreicht. Nach Beendigung der 1-Minutenanzzeichnung, führtes wir eine Spülung mit 2 ml NaCl durch, und erzielten dadurch einen ähnlichen Effekt, der allerdings bis zur 4. Minute anhält.

Der allgemeine Druck- und Frequenzanfall nach der 1. Minute ist durch eine lokal auftretende Blutung bedingt, die jedoch sofort behoben wurde.

Versuch 16 und 17

Während der Injektion ein Druckanstieg um $4/5/1$. In der post-injektionsen Phase ein Druckanstieg um $4/6/1$ gegenüber dem Ausgangswert. Nach 1 Minute liegen die Drücke um $4/5/1$ höher als der Ausgangswert und liegen somit gegenüber der post-injektionsen Phase um $5/1/1$ an. Von der 8. Minute an fällt der Druck kontinuierlich bis zu einem Minimum in der 10. Minute um $8/13/5$ ab. Die Frequenz schwankt parallel zur Atmung. Das Intervall nimmt in der 5. Minute um 7% zu und pendelt sich bis zur 10. Minute auf einen um 3% erhöhten Wert ein.

Versuch 18

Während der Injektion kommt es zu einem Druckanstieg um $4,5/5,8\%$, der bis zur 4. Minute anhält, um dann um 7,6% gegenüber dem Ausgangswert abzufallen. Schon in der 5. Minute sind die Werte erreicht, die nach der Injektion vorlagen. Signifikant ist ein Frequenzabfall nach der 10. Minute, der sich in einer Zunahme der Intervalldauer um 13,5% ausdrückt.

Versuch 19

Während der Injektion keine Besonderheiten. Erst nach einer Spülung mit NaCl noch vor Ablauf der 1. Minute fällt — insbesondere der systolische — Druck um 9% gegenüber dem Ausgangswert ab. In der 2. Minute beginnt sich der Druck wieder auf Ausgangswerte einzupendeln. Das Frequenzverhalten ist unauffällig.

Versuch 20

Noch während der Injektion steigt der Druck um $7/6\%$ an und erreicht in der 2. Minute wieder den Ausgangswert. Nachmals in der 4. Minute kommt es zu einem Druckanstieg um $7/6\%$, der sich in der 6. Minute wieder normalisiert hat.

Versuch 21

Während der Injektion ein leichter Anstieg des Druckes um $3/5\%$, der jedoch in der 1. Minute wieder Ausgangswerte erreicht hat. Bis zur 10. Minute kommt es kontinuierlich zu einem Druckanstieg um $1,3/12\%$ und von da an zu einem kontinuierlichen Abfall in der 20. Minute $4,7/7,7\%$ unter dem Ausgangswert. Die Intervalldauer nimmt von der 1. post-injektösen Minute bis zur 20. um ca. 6% zu.

Versuch 22

Keine Veränderung im injektösen und post-injektösen Verlauf. Erst in der 2. post-injektösen Minute ist ein geringer Druckanstieg, der in der 6. Minute sein Maximum mit $7,8/9,2\%$ über dem Ausgangswert erreicht hat zu verzeichnen. In der 15. Minute wieder Renormalisierung, in der 20. Minute nochmaliger Anstieg um $8/10\%$. Intervalldauer unverändert.

Versuch 23

Initial kommt es zu Beginn der Injektion zu einem Druckabfall um $7,7\%$, der jedoch noch vor Ende der Injektion wieder Ausgangswerte erreicht. Nach 1 Minute ist der Druck um $6/7\%$ unter den Ausgangswert abgesunken, hat sich jedoch bis zur 20. Minute wieder völlig renormalisiert. Die Intervalldauer ist bis zur 4. Minute unverändert, steigt dann um 6% an und fällt von der 15. zur 20. Minute gegenüber dem Ausgangswert um 6% , insgesamt also um 12% ab.

Versuch 24

Während der Injektion kommt es zu einem geringgradigen Druckanstieg, der jedoch in der 1. Minute wieder Ausgangswerte erreicht hat. Der arterielle Mitteldruck nimmt von seinem Höchstwert in der 10. Minute bis zu seinem Tiefpunkt in seiner 15. Minute um $26,6\%$ gegenüber dem Ausgangswert ab. Dies ist vor allem von einem Absinken des diastolischen Druckes verursacht.

Versuch 25

Geringgradiger Druckanstieg während der Injektion. Von der 4. Minute an sinkt der Druck bis zur 15. Minute um $5,8/12\%$ ab.

Versuch 26

Im Verlauf des Versuches kommt es lediglich zu einem kontinuierlichen Druckabfall um 5/13% gegenüber dem Ausgangsdruck. Frequenz unverändert.

Versuch 27

Während der Injektion und dem post-injektösen Verlauf keine Druck- oder Frequenzänderungen. In der 1. Minute kommt es zu einer Erhöhung des Druckes um 4,5/14%. von da aus zu einem Druckabfall um 2%/17%. Nach der 15. Minute kommt es parallel zum Druckabfall bis zur 45. Minute zu einer erheblichen Zunahme der Intervalldauer.

D. Diskussion

I. Methoden

Ziel dieser Arbeit ist es, ultrafiltrierbare Substanzen mit MG 500 - 10 000 zu untersuchen, die aus dem Kalbsmyocard stammen. Es war daher notwendig, die frisch entnommenen Herzen sauber zu entbluten, um nicht aus dem Blut stammende Substanzen in die Untersuchung mit einzubeziehen. Da lediglich das noch ungeronnene Blut durch Spülung zu entfernen war, begannen wir sofort nach Entnahme und grober Freipräparation von Lunge und Bindegewebe mit der Spülung. Es war in jedem Fall möglich, die Coronargefäße von makroskopisch sichtbaren Blutresten zu befreien. Wir konnten daher auf die von NOWY (28) vorgeschlagene Methode - die schlagenden Herzen mit Spülflüssigkeit zu reinigen - verzichten.

Da wir das gewonnene Material jeweils sofort einfrieren und selbst als Lagerungstemperatur -18°C nicht überschritten, verzichteten wir auch auf den Zusatz von Antibiotika (Contamination) sowie Enzymstoppnern (Autolyse).

Um nicht Herzen coronargeschädigter bzw. anderweitig erkrankter Tiere zu verwenden, verwendeten wir als Spender ausschließlich junge Kälber. Zudem stützten wir uns auf das Untersuchungsergebnis des tierärztlichen Fleischbeschauers.

Wie KROMANN und WINNTERBOTTOM (24) zeigten, kommt es zu einer geringgradigen Zunahme niedermolekularer Proteine bei gealtertem und gefrorenem Skelettmuskel. Diese wahrscheinlich hydrolytischen Vorgänge dürfen wohl auch am Herzmuskel unterstellt werden. Zwar zeigten KROMANN und WINNTERBOTTOM, daß dieser Effekt quantitativ nicht sehr bedeutend ist, dennoch versuchten wir durch schnelles Verarbeiten des Materials die unerwünschte Proteinspaltung auf ein Minimum zu reduzieren. Die Hydrolyse ist wohl eher eine Folge zu langer Tiefkühlung, da BAUER (4) zeigen konnte, daß wiederholtes Auftauen und Einfrieren nicht zur Pherogrammänderung von Muskelproteinen führt.

Da die zur Extraktion notwendige Homogenisierung zu Proteindenaturierung führt (29), versuchten wir die Zeit von 2 Min. für diesen Vorgang nicht zu überschreiten (35).

Als Extraktionsmittel verwendeten wir Aqua dest. Wir gewannen somit ein hydrophiles Gemisch. Mac INTOSH (26) und ELIOTT (18) zeigten, daß beispielsweise die Extraktion von Acetylcholin oder von Bradykinin bereits ein spezielles Extraktionsverfahren erforderlich machen.

Zur Trennung des Materials bedienten wir uns zunächst der Methode der Ultrafiltration. Grundsätzlich ist diese Methode sogar geeignet, das Molekulargewicht (5) zu bestimmen. Die von uns verwendeten Diallo-Membranfilter verwenden als filtrierendes Medium eine Cellophanfolie. Diese sehr schonende Filtrationsmethode besitzt jedoch keine absolute Selektivität (3, 9). Der von uns verwendete Filter UM 10 hatte seine Trennungsgrenze bei einem Molekulargewicht von 10 000. Es ist jedoch damit zu rechnen, daß Teilchen mit einem Molekulargewicht von 25 000 zu etwa 10% das Filter passieren können (5).

Die 4 durch ihre Molekulargewichte charakterisierten Fraktionen (KA, KB, KC, KD) teilten wir nur unter Anwendung der chromatographischen Methode in weitere Fraktionen auf. Das entscheidende Kriterium nach dem die Trennung erfolgt ist der Moleküldurchmesser (1, 2, 12, 34). Diese Methode wäre durchaus geeignet, das Molekulargewicht annäherungsweise zu bestimmen (6, 17, 30). Da die Trennung des Extrakts in Einzelfraktionen ohnehin willkürlich war, konnten wir darauf verzichten, eine streng qualitative Trennung herbeizuführen. Wir hätten diese nötigenfalls durch die Veränderung der Ionenstärke die ihrerseits zu einer Veränderung der Hydrathülle und somit zu einer Veränderung des Moleküldurchmessers führt (36) erreichen können. Neben der Möglichkeit einer Zonenspreizung durch eine Veränderung der Ionenstärke des Elutionsmittels herbeizuführen, könnte man auch durch Variation der Durchflußgeschwindigkeit (35, 37) eine Veränderung der Spreizung erzielen.

Da wir die Auftrennung des gesamten uns zur Verfügung stehenden Materials in der selben Säule durchführten, war es nicht notwendig, den Verteilungskoeffizienten zu errechnen. LAURENT (25) gab an, wie die Elution eines Stoffes in Abhängigkeit von bestimmten Charakteristika einer Säule sowie ihrer Bepackung zu beurteilt ist. Autoren, die mit anderen Säulen experimentieren, können durch Berechnung des Verteilungskoeffizienten, das aus charakterisierte Fraktionen in einem Eluenten finden.

Ein weiterer Faktor der sich auf das Elutionsvolumen einer Substanz auswirkt, ist ihr osmotischer Druck (14). Da wir jedoch bei Fraktionen KC die Konzentration der 3 aufgetragenen Proben nicht veränderten, konnte dieser Effekt bei uns nicht wirksam werden.

Zur Durchführung der Tierversuche verwendeten wir Kaninchen. Um durch Schmerzreize hervorgerufene Veränderungen am Kreislauf des Kaninchens auszuschließen stellten wir eine ausreichend tiefe Narkose her. Dieses Stadium III (Planung) hielten wir für erreicht, wenn der Cornealreflex gerade erloschen war. Da jedoch vegetative Reflexe – insbesondere bei Präparation im Bereich des Nervus vagus – zu störenden Effekten hätten führen können, warteten wir nach Abschluß der Präparation bei bestehender Versuchsanordnung bis die von uns gemessenen Parameter (Blutdruck, Frequenz und EKG) sich unter Monitorkontrolle stabilisiert hatten. Der venöse Zugang (eine Braunüle) wurde von uns so fixiert, daß eine Manipulation bei der Injektion nicht zu einer Vagusirritation führte.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit beschränkt sich auf die akuten Effekte am Kaninchenkreislauf. Wir warteten daher nach jeder Injektion solange, bis die Parameter in etwa wieder Ausgangswerte erreicht hatten, mindestens jedoch 7 Min. Da in fast allen Fällen die durch den Eingriff sowie die Narkose verursachte Belastung des Tieres zu einem über Stunden verlaufenden Druckabfall führte, brachen wir den Versuch ab, wenn der Druckabfall auffällig rasch vonstatten ging.

Da die Gesamtmenge der bei der Gelchromatographie gewonnenen Fraktion mitunter weniger als 1 mg betrug, ergab sich für uns das Problem, die Fraktion so aufzuteilen, daß ggf. eine Dosiswirkungskurve erstellt, bzw. der Versuch reproduziert werden kann. Da wir von keiner der gewonnenen Substanzen etwas über ihre Wirksamkeit wußten und somit auch nichts über die wirksame Dosis aussagen konnten, entschlossen wir uns, auf die Reproduzierbarkeit zu verzichten, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, einen möglicherweise enthaltenen Effekt nicht durch eine zu geringe Dosis zu übersehen. Wir sind uns darüber im klaren, daß die endgültige Aussage über die Effektivität eines z.B. enthaltenen Peptids bzw. Peptidgemisches erst nach Wiederholung des Versuches bzw. nach Erstellung einer Dosiswirkungskurve möglich ist.

Die selbe Überlegung zwang uns auch die 4 als Ausgangsmaterial verwendeten Kalbsherzen gemeinsam zu verarbeiten. Auch hier hätte sich durch eine getrennte Aularbeitung eine Verunreinigung, oder evtl. vorhandene Inhomogenität der Stoffzusammensetzung aufdecken lassen. Jedoch schien uns wie gesagt die Erfassung eines Effektes wichtiger, als die absolute Sicherheit über seine Herkunft.

Unsere Arbeit muß somit als Vorstudie für weitere Untersuchungen, insbesondere derjenigen Fraktionen in denen wir Effekte nachweisen konnten, angesehen werden. Selbstverständlich ist nicht ausgeschlossen, daß auch in Fraktionen, die bei uns ein negatives Testergebnis zeigten, Effekte enthalten sind. Dazu müßte entweder die Dosis erhöht oder durch Verwendung eines weniger gewichtigen Versuchstieres (z.B. Ratte) das Verteilungsvolumen für die Dosis verringert werden. Vielleicht kann auch die mehrmalige Wiederholung eines Versuches einen enthaltenen Effekt aufdecken.

II. Ergebnisse

Gegenüber anderem menschlichem Gewebe, wie Gehirn, Niere oder Leber, wurde der Herzmuskel bisher nur wenig — bezüglich der Zusammensetzung niedermolekularer Stoffe — untersucht. So wurden beispielsweise Stoffe wie Carnosin (10) und Glutathion (37) im Herzmuskel gefunden.

JACKSON und TEMPLE konnten aus Katzenmyocard eine Substanz isolieren, die sie Splenitransin nannten. Diese sehr niedermolekulare Substanz (MG ca. 350) wirkt auf den Papillarmuskel kontraktionsfördernd. Auch JACKSON bediente sich zur Auftrennung einer mit Sephadex G-10 bepackten Chromatographiesäule, extrahierte jedoch mittels eines anderen Verfahrens (21).

Bereits in den 50iger Jahren gelang es, den Katecholamidgehalt von Myocard quantitativ zu bestimmen (11, 19, 40). Bei Versuchen mit Myocardextrakten konnten JACOB und MEITRE nach Injektion ein biphasisches Blutdruckverhalten feststellen. Der zunächst erfolgende Druckabfall ist vermutlich durch Phosphorsaurester des Adenosins verursacht. Der darauf folgende Anstieg von einer katecholaminähnlichen Substanz (22).

REUTHER (14) isolierte eine katecholaminartige Substanz aus dem menschlichen Myocard aus Harnextrakten. JOHNSON (23) untersuchte die katecholaminartige Substanz

die im Myocard enthaltenen freien Aminosäuren (23).

DONHAUSER (47) trennte ninhydrinpositive hydrolysierbare Bestandteile des Kalbsmyocards voneinander. Es gelang ihm darüberhinaus die Identifikation einiger Amine und Oligopeptide.

HAISS (20) versuchte die Strukturauklärung eines dieser niedermolekularen Bestandteile mit einem MG unter 500.

Sowohl in Versuch 11/1 als auch in Versuch 11/2 kommt in der post-Injektionsphase zu einem deutlichen Abfall des systolischen und diastolischen Druckes der sich bis zur 1. Minute wieder normalisiert. In Versuch 12 findet dieser Druckabfall bereits während der Injektion statt. Auch in Versuch 13 kann man angedeutet während der Injektion einen minimalen Abfall von systolischen und diastolischem Blutdruck feststellen. Es wäre denkbar, daß dieses Druckverhalten durch eine Substanz verursacht ist, die hauptsächlich in Fraktion 12 enthalten ist.

Geringere Anteile dieser Substanz könnten auch vor (Fraktion 11) bzw. nach (Fraktion 13) Fraktion 12 ausgelaufen sein. Auch in Versuch 14 kommt es nach der Injektion zu einem deutlichen Druckabfall.

In den Versuchen 15-21 scheint es bereits während der Injektion zu einem Druckanstieg zu kommen, der in Versuch 16 und 17 von einer geringen negativen Nachschwankung gefolgt ist. In Versuch 18 hat sich dieser Druckanstieg bis zur 2. Minute wieder normalisiert, während er in Versuch 19 nach einer Spülung mit NaCl erst seinen Höhepunkt erreicht. Erst nach durchlaufen dieses Maximums kommt es zu einer negativen Nachschwankung. Bei Versuch 20 hält der Druckanstieg bis zur 1. Minute an, um in der 2. und 3. Minute eine geringgradig negative Nachschwankung zu erfahren, die sich bis zur 4. Minute wieder erholt hat. In Versuch 23 kommt es initial bei der Injektion zu einem deutlichen Druckabfall. Noch während der Injektion wird eine positive Nachschwankung durchlaufen und nach der 1. Minute liegen die Druckwerte tiefer als vor Versuchsbeginn. Von da an kommt es bis zur 15. Minute zu einem kontinuierlichen Druckanstieg, der in etwa bei Erreichen der Ausgangswerte sistiert. In den Versuchen 24-27 kommt es zu keinen nennenswerten Druckveränderungen.

Da die von uns verwendeten Methoden bezüglich der Molekulargewichte keine absolute Trennschärfe aufweisen, ist zu erwarten, daß kreislaufwirksame Substanzen nicht nur in einer Fraktion enthalten sind. Vielmehr müssen Reste davon in den Fraktionen vor, bzw. nach der den Haupteffekt zeigenden Fraktion mit enthalten sein. Es muß weiteren Untersuchern vorbehalten bleiben zu entscheiden, in welcher Molekulargewichtsklasse jenes Material hauptsächlich enthalten ist, das den Blutdruckabfall in den Fraktionen 11-14 verursacht. Auch der in den Versuchen 15-21 enthaltene unterschiedlich lange Blutdruckanstieg bedarf einer weiteren Abklärung.

Der im Bereich der Minutenwerte liegende kontinuierliche Druckanstieg in den Fraktionen 21, 22, 23 und 24, der am deutlichsten im Versuch 23 ausgeprägt ist, muß weiter untersucht werden.

E. Zusammenfassung

Wir isolierten aus dem Homogenat von 3 Kalbsherzen, die zusammen ein Kammergewicht von 2055,5 g hatten, ein Substanzgemisch mit Molekulargewichten von 500-10000. Dazu bedienten wir uns physiko-chemischer Methoden wie Extraktion, Zentrifugierung, Ultrazentrifugierung und Ultrafiltration. Das Resultat dieser Verfahren waren 4 Fraktionen, die wir mit KA, KB, KC und KD bezeichneten. Während Substanzen mit einem Molekulargewicht über 10000 (KA, 10,76 g) und unter 500 (KD, 9,233 g) von anderen Untersuchern weiterverarbeitet wurden (32), wandten wir uns der Auftrennung der Fraktion KB (0,06 g) und KC (0,476 g) zu. In einer Chromatographiesäule, die mit dem Dextrangel, Sephadex G 10 bepackt war, trennten wir das Substanzgemisch in 13, nach Auswaschvolumen charakterisierten Portionen auf. Diese 13 Portionen injizierten wir mit Urethan narkotisierten Kaninchen. Zur Durchführung der Versuche benötigten wir 5 Tiere. Wir registrierten den arteriellen Blutdruck mittels einer, in die Arteria carotis eingebundenen und an ein Druckmeßgerät angeschlossenen Kanüle, während wir das zu untersuchende Material in die Vena jugularis der Gegenseite injizierten. Durch Nadelelektroden leiteten wir die 3 Standardableitungen des EKG's ab, was uns zugleich die Messung der Schlagfrequenz erlaubte. Durch kontinuierliche Aufzeichnung unmittelbar nach der Injektion und intermittierende Aufzeichnung bis zur 20. Minute versuchten wir akute Effekte zu registrieren.

Die injizierten Substanzen sind wieder auffindbar, indem sie durch ihr Flutionsvolumen charakterisiert sind. Die somit reproduzierbaren Versuche ergaben einen Blutdruckabfall in den Versuchen 11-14, einen in der post Injektionsphase liegenden Blutdruckanstieg in den Versuchen 15-21 und einen über Minuten gehenden Blutdruckanstieg in den Versuchen 21-24. Ferner kam es in Versuch 23 initial zu einem Blutdruckabfall, gefolgt von einem Blutdruckanstieg.

Tabelle Nr. 1

Hase Nr.	Tag	Gewicht (Kg)	Urethan/ kg KG (ml/kg)	Vers. dauer	Präp. dauer	Zahl der Frakt.	Besonderheiten
1	5.6.72	3.010	4.65	5 h 45'	1 h	5	am Ende Hyper- tensin, NaCl- Infusion
2	6.6.72	2.040	4.41	3 h 42'	1 h 20'	1	blutiger Urin- abgang, starker Druckabfall
3	7.6.72	3.740	3.21	4 h	1 h 37'	6	rechte v. Jug. abgerissen
4	12.6.72	3.470	2.87	4 h 47'	53'	7	
5	12.6.72	2.930	3.24	-	-	-	verblutet
8	14.7.72	2.505	3.19	3 h 40'	40'	-	Blindversuch NaCl, abnormer Effekt
9	2.3.73	3.750	4.80	-	-	-	verblutet
10	2.3.73	2.450	3.26	3 h 30'	1 h 42'	-	Blindversuch Film unleserl. da Entwickler zu schwach
11	27.3.73	3.090	3.0	6 h 35'	1 h 20'	-	Blindversuch

(Die Hasen Nr. 6 und 7 wurden von anderen Untersuchern verwendet)

Tabelle Nr. 2

Frakt. Nr.	Hase Nr.	Inhalt	vorhand. Menge (mg)	gespritzte Menge (mg)	gelöst in ml NaCl ml gespritzt
10	1	KB 18	1,9	1,3	0,7
11/1	1	KB 19	11,2	1,12	0,2
11/2	1	KB 19	11,2	5,6	1
12	1	KB 20	4,1	1,02	0,5
13	2	KB 21	11,6	10,44	0,9
14	3	KB 22	7,9	7,11	1,8
15	3	KB 23	3,2	3,2	2,0
16+17	3	KB 24,25	0,3	0,3	2,0
18	3	KB 26	19,6	9,8	1,0
19	3	KB 27,28 29,30 31,32 33,34	11,6	2,9	0,5
20	3	KB 35,36 37,38 39,40 41,42 43,44 45,46 47,48 49	2,1	2,1	0,7
21	4	KC I: 19 KC III: 20	0,2	0,2	1,0
22	4	KC I: 20 KC III: 21	3,3	3,3	1,0
23	4	KC I: 21 KC III: 22	7,6	7,6	1,0
24	4	KC I: 22 KC III: 23	12,0	6,0	0,5
25	4	KC I: 23 KC III: 24	17,5	8,75	0,5
26	4	KC I: 24 KC III: 25	29,9	7,47	0,5
27	4	KC I: 25, 26,27 KC III: 26,27,28	182,9	18,29	0,2

F. Literaturverzeichnis

1. ANDREWS, P.: The Gel-Filtration behaviour of proteins relate to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96, 595 (1965).
2. ANDREWS, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91, 222 (1964).
3. ARONSSON, T.: A simple apparatus for ultrafiltration. *The scand. J. of Clinical and Lab. Invest.* 9, no. 1, 95 (1957).
4. BAUER, H., GLÖTZNER, F. et al: Elektrophoretische und immunoelektrophoretische Studien über Muskelproteine. *Klin. Wschr.* 42, 1198 (1964).
5. BLATT, W.F. and HUDSON, B.G. et al: *Nature* 216, 511 (1967).
6. CARNEGIE, P.R.: Estimation of molecular size of peptides by gel filtration. *Biochem. J.* 95, 9 (1965).
7. CLOTTEN, R. und CLOTTEN, A.: *Hochspannungselektrophorese*. Thime, Stuttgart 1962.
8. CHRISTMAN, A.A.: Determination of anserine, carnosine and other histidine compounds in muscle extractives. *Anal. Biochem.* 39, 181 (1971).
9. CRAIG, L.C. et al: Dialysis Studies Part II, some experiments dealing with the problem of selectivity. *J. of the Americ. Chem. Soc.* 79, 3729 (1957).
10. CRUSH, K.G.: Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 34, 3 (1970).
11. DAVIES, F., FRANCIS E.T.B., STONER, H.B.: *J. Physiol. Lond.* 106, 154 (1947).
12. DETERMAN, H.: *Gelchromatographie*. Springer, Heidelberg 1967.
13. DONHAUSER, S.: Über hydrolysierbare, ninhydrinpositive Bestandteile des Myokards Inaug. Diss. München 1968.
14. EDMOND, E., FARQUHAR, S., DUNSTONE, J.R.: The osmotic behaviour of Sephadex and its effect on chromatography. *Biochem. J.* 108, 755 (1968).
15. ELLIOTT, D.F.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 104, 35 (1963).
16. GLENN, T.M., LEFFER, A.M. et al: Production of a myocardial depressant factor in cardiogenic shock. *Americ. Heart J.* 82, no 1, 78 (1971).
17. GOODSON, J.M. et al: Calibration of tightly cross linked gel filtration media for determination of the size of low molecular weight, non-inter-acting solutes. *J. Chromatogr.* 54, 43 (1971).
18. GUGGENHEIM, M.: *Die biogenen Amine*. S. Karger Verlag, Basel 1961.
19. HARVEY, S.C.: *Americ. J. Physiol.* 183, 559 (1955).
20. HAISS, F.: Isolierung einer ninhydrinpositiven hydrolysierbaren Substanz aus dem Kalbsmyokard. Inaug. Diss. München, 1973.
21. JACKSON, D.M., TEMPLER, D.M. et al: The distribution of β -cardiotanin in splenitransin in mammalian tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 419 (1969).

22. JACOB, J., MAITRE, L.: Analyse chromatographique et pharmacologique d'extraits de coeurs de lapin et de cobaye. Arch. int. Pharmacodyn. 1, 158 (1965).
23. KOTHINY, K.: Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen der freien Aminosäuren des Kalbsherzens. Inaug. Diss. München 1968.
24. KROMANN und WINNTERBOTTOM: Post-mortem changes in the water soluble proteins of bovine skeletal muscle during aging and freezing. J. Agric. food Chem. 8, 67 (1960).
25. LAURENT, T.C. and KILLANDER, J.: A theory of gel filtration and its experimental verification. J. Chromatogr. 14, 317 (1964).
26. Mac INOSH, F.C.: Methods Med. Res. 3, 78. Year Book publishing company 312. (1950).
27. MERTZ, D.P.: Über das Wesen der Kininhormone. Wiener Klin. Wschr. 79, Nr. 10, 169 (1967).
28. NOWY, H. und SEITZ, W.: Elektrophoretische Untersuchungen des Kaninchenherzens. Z.ges. exp. Med. 126, 1 (1955).
29. POEL, W.E.: Science 108, 390 (1948).
30. POVEY, N. und HOLM, R.A.: J. Chromatogr. 46, 33 (1970).
31. REHN, J. und ZIEGLER, E.: Neue Gesichtspunkte zur Pathogenese des Kollapses. Dtsch. Med. Wschr. 83, 560 (1958).
32. SCHMID, R.: Med. Poliklinik der Uni. München, Dissertation München. 1975.
33. SCHMID, R.: persönliche Mitteilung 1975.
34. SIEGEL, L.M. and MONTY, K.J.: Biochim. Biophys. Acta 112, 346 (1966).
35. STERN, R. und BIRD, L.H.: Biochem. J. 44, 635 (1949).
36. SWEETMAN, L. und NYHAM, W.L.: J. Chromatogr. 32, 662 (1968).
37. TJUTCEV, N., MÄSIAR, P.: The metabolism of protein substances in muscle tissues. A study of ninhydrinpositive substances isolated from non-protein extracts from the heart of normal rats. Physiol. Bohem. 13, 565 (1964).
38. TRACEY, M.V. and WINZOR, D.J.: Interpretation of zonal asymmetry in gel filtration. Arch. Biochem. Biophys. 117, 184 (1966).
39. WASTERNAK, C.: Gel Chromatography of low molecular weight compounds. Pharmacie 27, 67 (1972).
40. WOLLENBERGER, A., KARSCH, M.L.: J. Pharmacol. 105, 447 (1952).
41. WOLLHEIM, E. und NAST, H.-P.: Ein humoraler Faktor in der Genese der essentiellen Hypertonie. Klin. Wschr. 49, Heft 7, 426 (1971).

G. Anhang (Abbildungen 1 - 24)

Legende zu den Abbildungen Nr. 1 - 4

Es sind die Ausläufe der Gelchromatographie dargestellt. Die Ordinate gibt die Transmission in % an. Auf der Abszisse sind am unteren Bildrand die 1/2stündlich wechselnden Fraktionen angegeben; am oberen Rand ist das Elutionsvolumen aufgeführt, in dem die Fraktion erscheint.

Legende zu den Abbildungen Nr. 5 - 23

Abszisse: Auf der Abszisse ist die Zeit angegeben. Dabei entspricht einem bzw. zwei Punkten ein Herzschlag. Zunächst ist die Aufzeichnung kontinuierlich. Zwischen den beiden mit I gekennzeichneten Schlägen erfolgte die Injektion. Im weiteren Verlauf sind die Minutenwerte angegeben. Diese wurden durch Mittelwertbildung aus einem oder mehreren Atemzyklen errechnet. Auf der Ordinate ist in der unteren Spalte der arterielle Blutdruck in mm Hg angegeben. Die nächste Spalte stellt die Intervalldauer in msec dar. Darüber ist der arterielle Mitteldruck in mm Hg aufgeführt.

Legende zu Abbildung Nr. 24

Die Abb. zeigt einen Ausschnitt aus der Originalaufzeichnung. Das obere Bild bei einem Vorschub von 50 mm/sec, das untere bei 100 mm/sec. Die oberste Kurve zeigt den arteriellen Blutdruck in der Arteria carotis communis. Die 3 darunter liegenden stellen die Einthovenableitungen dar. Die Hebung in Ableitung III (oberes Bild) markiert einerseits die Injektionsdauer, andererseits eichten wir damit die Druckmessung.

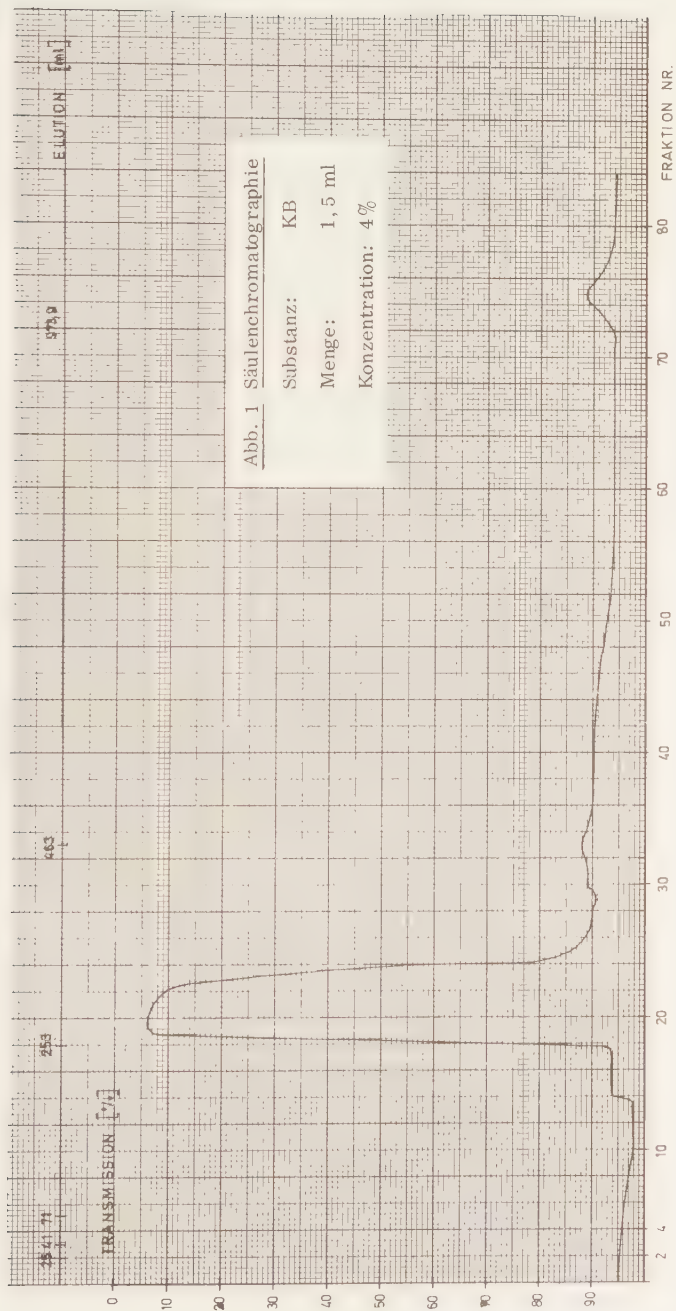
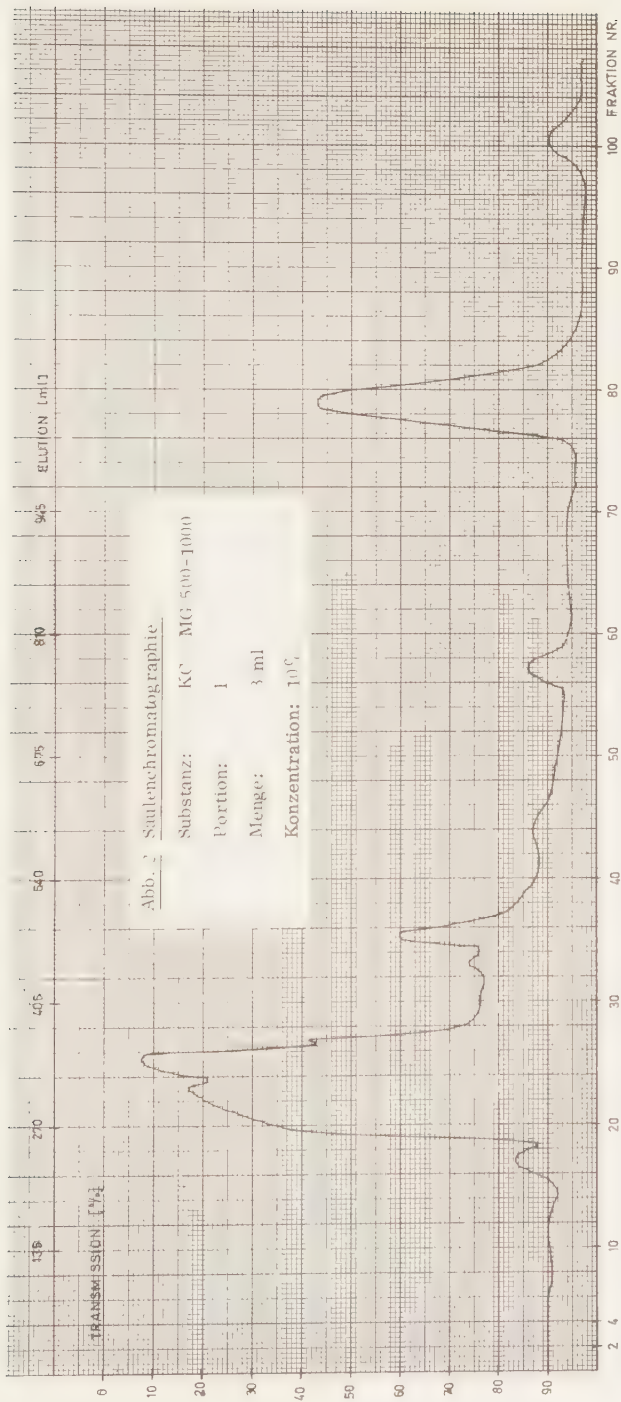
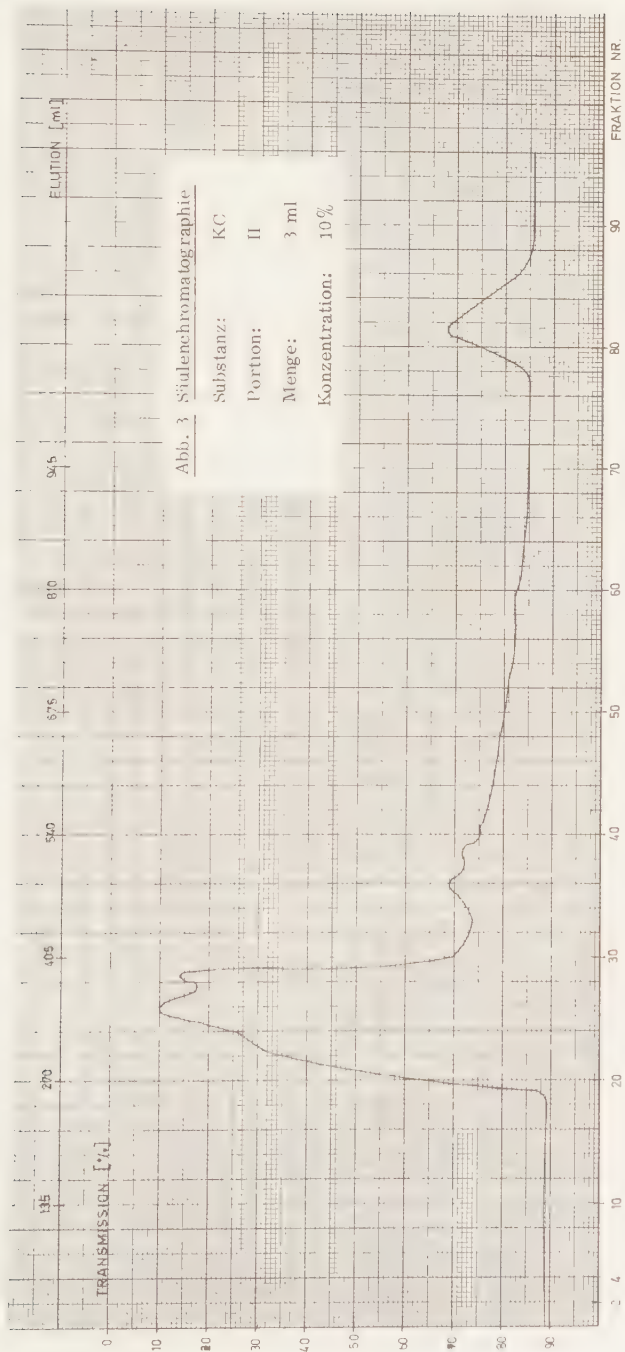
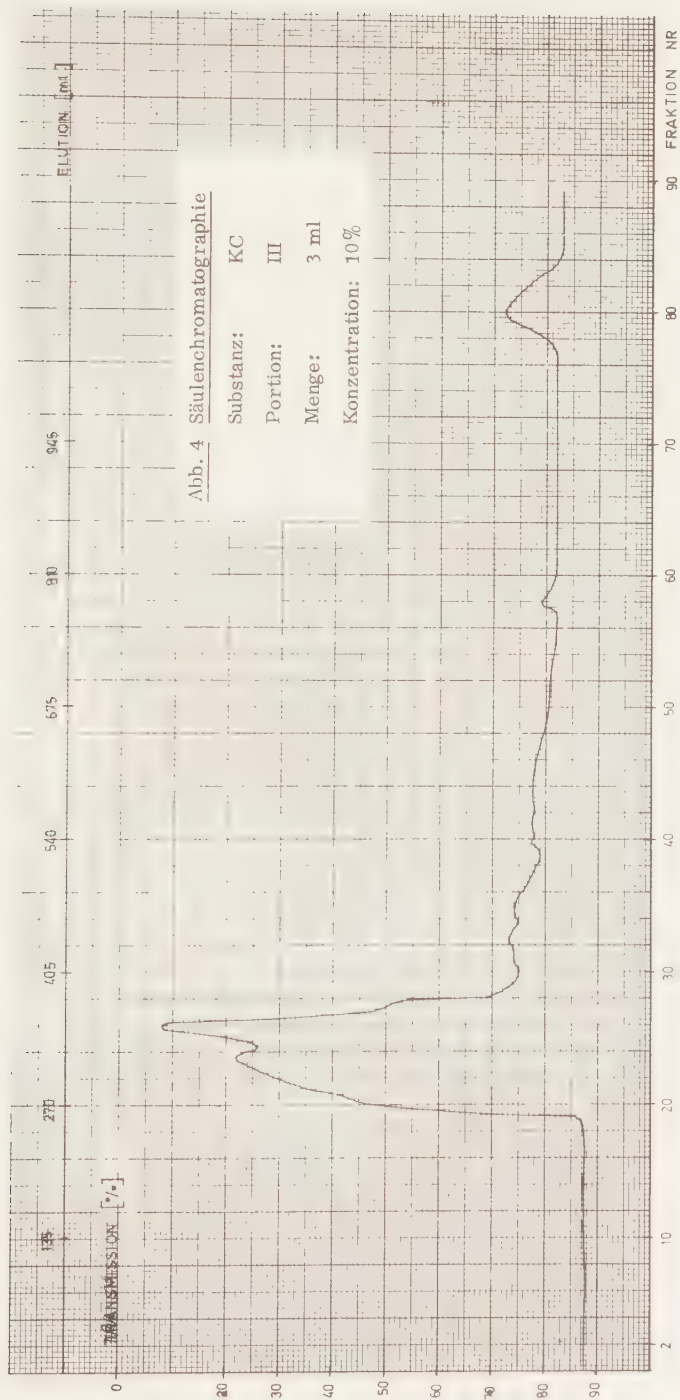


Abb. 1 Säulenchromatographie

Substanz: KB
 Menge: 1,5 ml
 Konzentration: 4 %







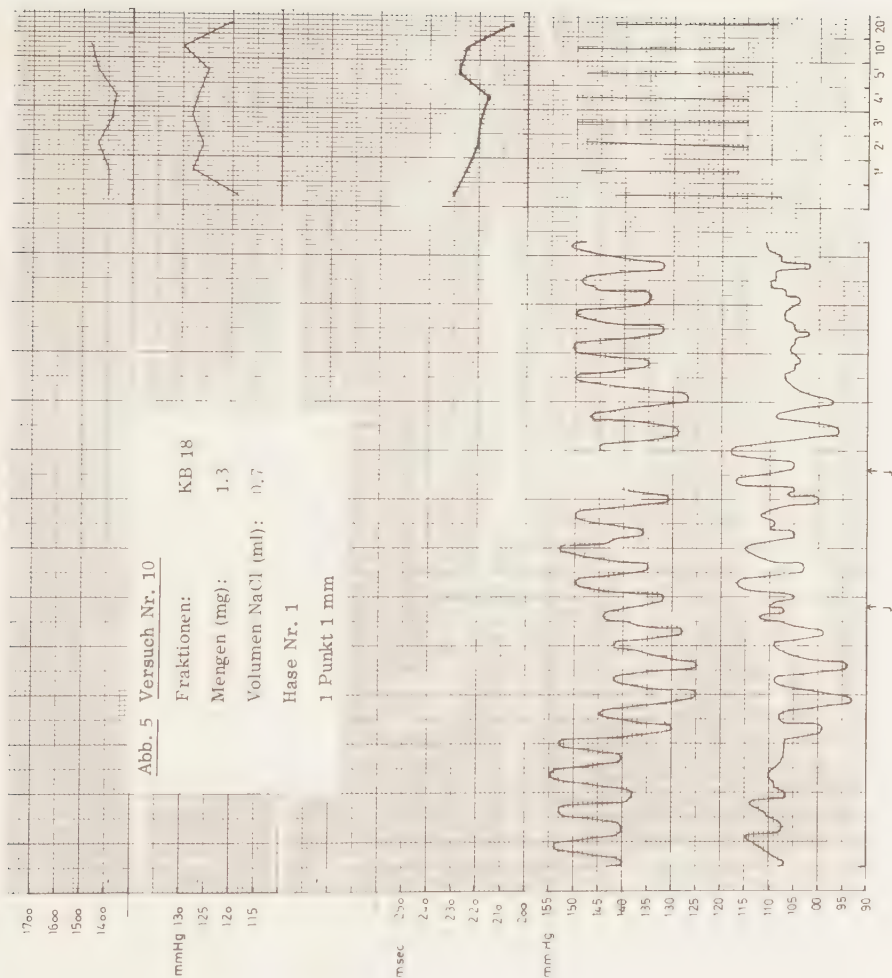


Abb. 6 Versuch Nr. 11/2

Fraktionen:

KB 1^a

Mengen (mg):

5,6

Volumen NaCl (ml)

1,0

Hase Nr. 1

1 Punkt 1 mm

120

100

80

230

210

190

145

140

135

130

125

120

115

110

105

100

95

90

85

80

75

70

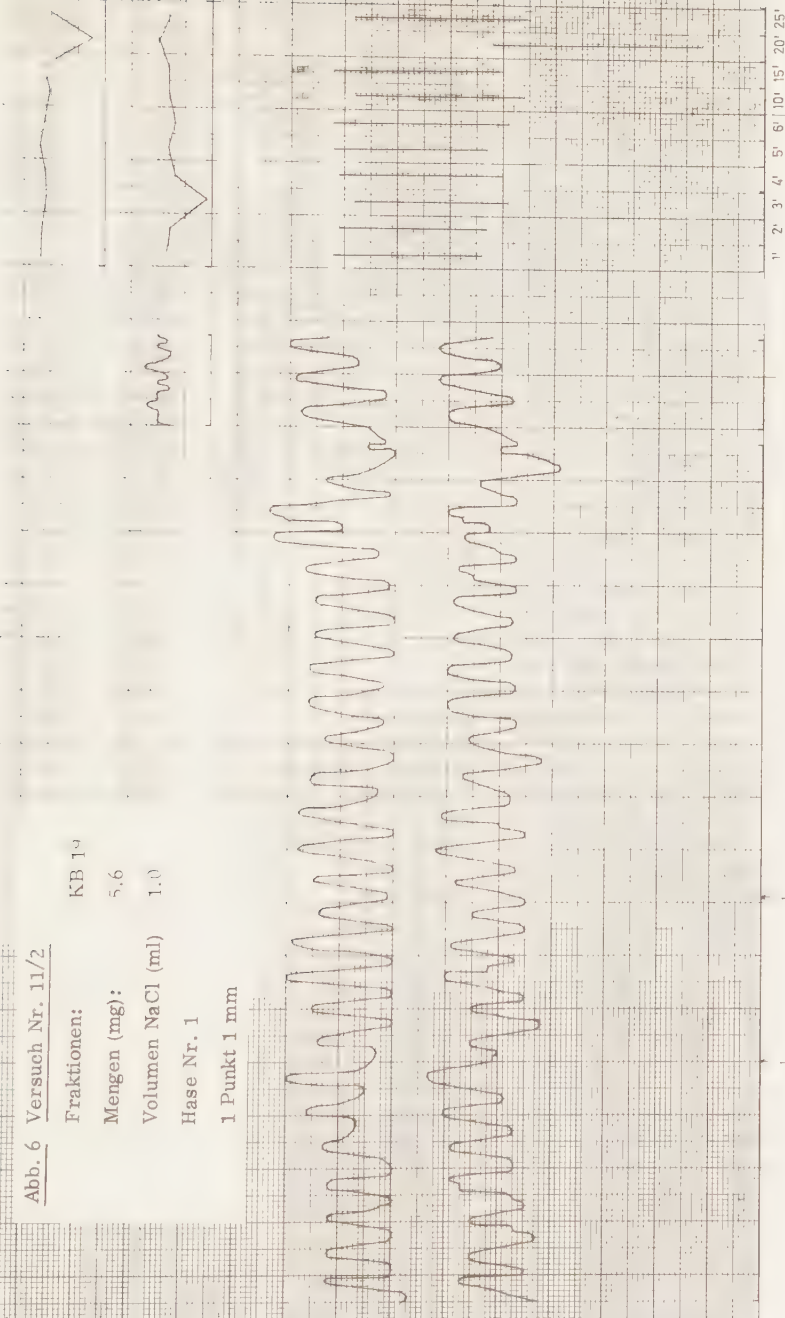
65

60

55

50

45



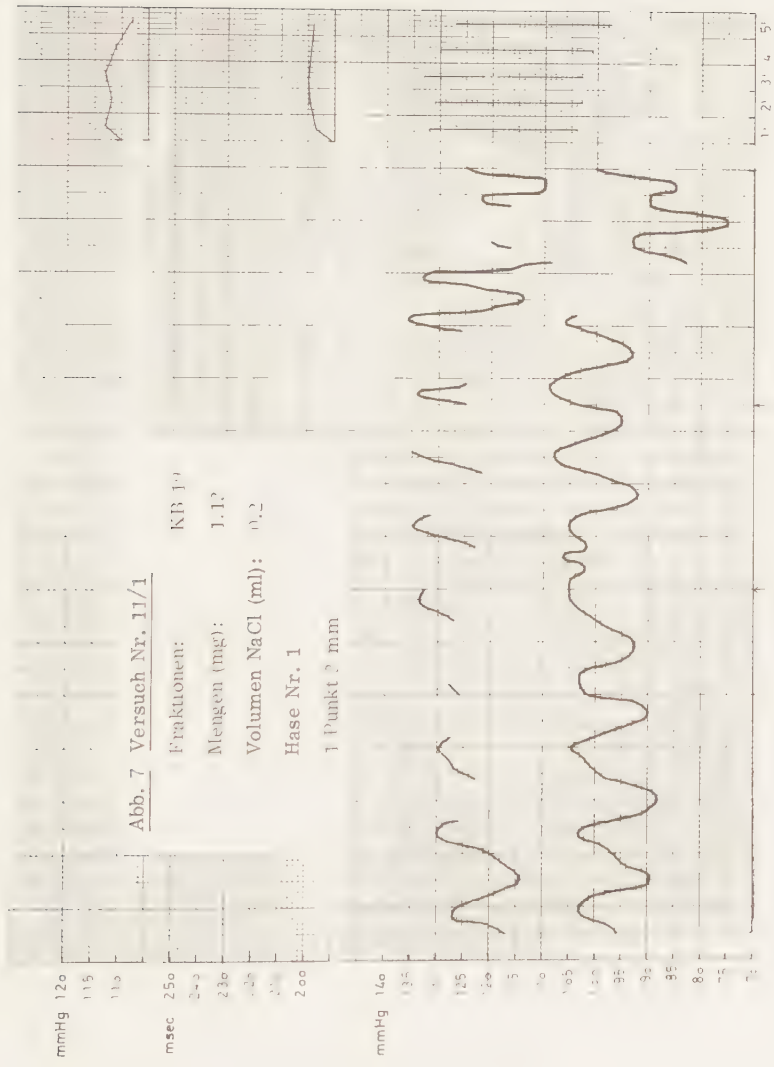


Abb. 7 Versuch Nr. 11/1

Fraktionen: KR 10
Mengen (mg): 1.12
Volumen NaCl (ml): 0.2
Hase Nr. 1
1 Punkt 2 mm

mmHg

100

95

90

Abb. 8 Versuch Nr. 12

Fraktionen:

KB 20

Mengen (mg):

1,02

Volumen NaCl (ml):

0,5

Hase Nr. 1

1 Punkt 1 mm

msec

220

215

200

mmHg

125

120

115

110

105

100

95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

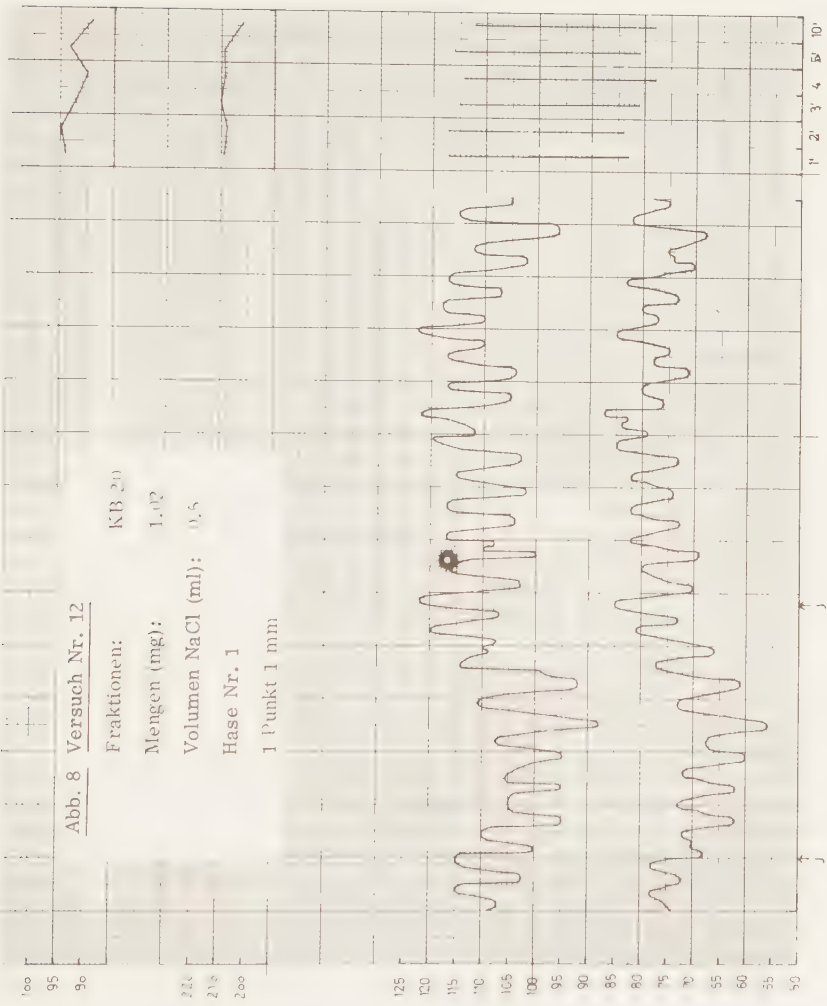


Abb. 9 Versuch Nr. 13

Fractionen: KB 21

Mengen (mg): 10,44

Volumen (ml) NaCl: 0,9

Hase Nr. 2

1 Punkt 1 mm

msec

280
270
260
250
240
230

mm Hg

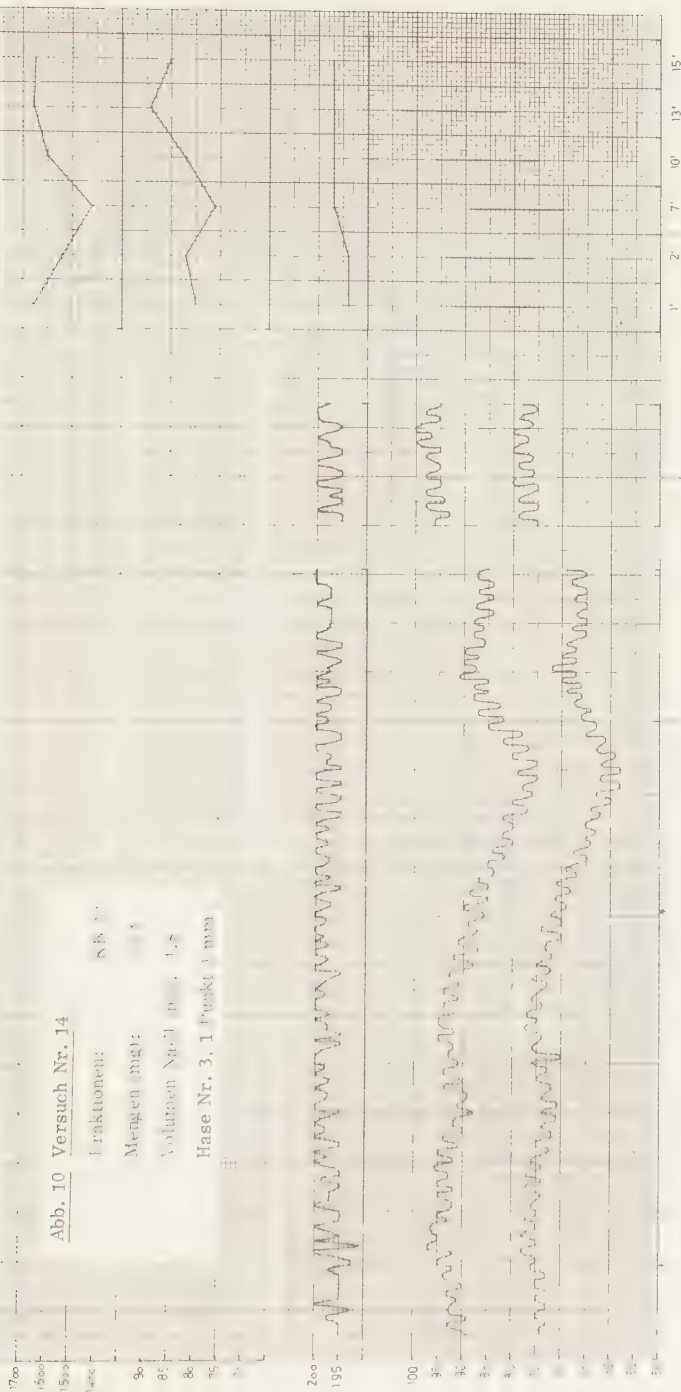
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20



2' 3' 4' 5' 10' 15'

Abb. 10 Versuch Nr. 14

Fraktionen: 8, 5, 3
 Mengen in g: 1, 2
 Volumen NaCl in ml: 1, 2
 Hase Nr. 3, 1 Punkt 1 mm



mmHg



Abb. 11 Versuch Nr. 15

Fractionen: KB 23

Mengen (mg): 3.2

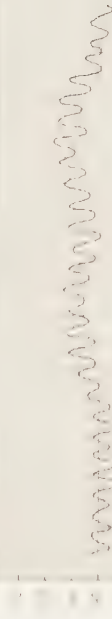
Volumen NaCl (ml): 2.0

Hase Nr. 3, 1 Punkt 1mm

mmHg



mmHg



1' 2' 3' 4' 5' 10' 15'

Abb. 12 Versuch Nr. 16+17

Fractionen: KB 24 und KB 25

Mengen (mg): 0,3

Volumen NaCl (ml) 2.0

Hase Nr. 3. 1 Punkt 1 mm

mm Hg

90

85

80

75

70

msec

220

215

200

195

mm Hg

105

100

95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

20

15

10

5

0

1' 2' 3' 4' 5 10' 15 16

mm Hg

Abb. 13 Versuch Nr. 18

Fractionen

KR 26

Mengen (mg):

9.8

Volumen NaCl (ml): 1.5

Hase Nr. 3, 1 Punkt 2 mm

mmsec

8.5

7.5

6.5

5.5

4.5

3.5

2.5

1.5

0.5

0

-0.5

-1.5

-2.5

-3.5

-4.5

-5.5

-6.5

-7.5

-8.5

-9.5

-10.5

-11.5

-12.5

-13.5

-14.5

-15.5

-16.5

-17.5

-18.5

-19.5

-20.5

-21.5

-22.5

mm Hg

100

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

-10

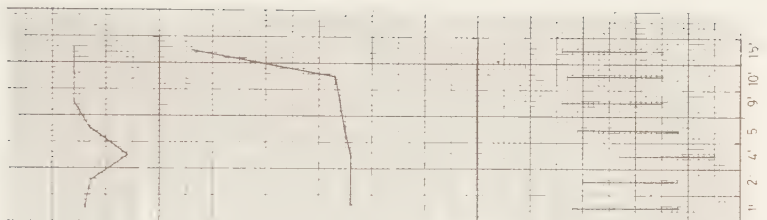
-20

-30

-40

-50

-60



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 15

Abb. 14 Versuch Nr. 19

Fractionen: KB 27 bis KB 34

Mengen (mg) 2.9

Volumen NaCl (ml) 0.5

Hase Nr. 3, 1 Punkt 2 mm

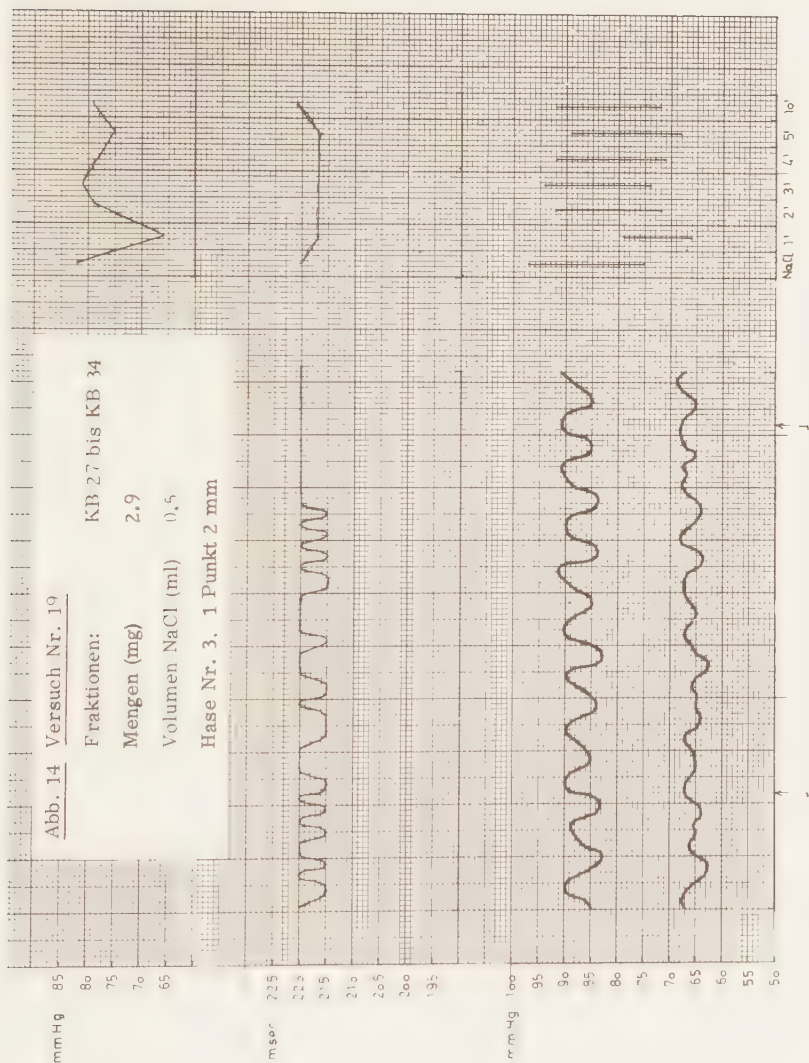


Abb. 15 Versuch Nr. 20

mm Hg 80
75
70
65

Fractionen: KB 35 bis KB 49
Mengen (mg): 2.1
Volumen NaCl (ml): 0.7

Hase Nr. 3, 1 Punkt 2 mm



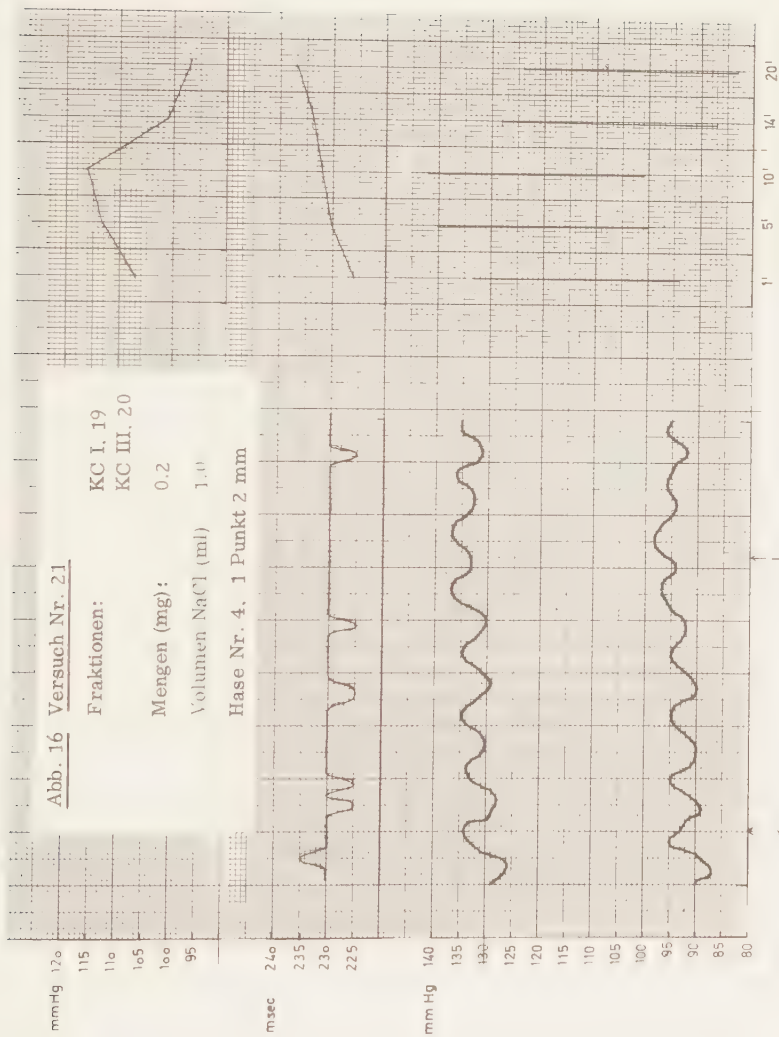


Abb. 16 Versuch Nr. 21

Fraktionen:
KC I. 19
KC III. 20

Mengen (mg): 0.2

Volumen NaCl (ml) 1.0

Hase Nr. 4. 1 Punkt 2 mm

Abb. 17 Versuch Nr. 22

Fraktionen:

KC I, 20
KC III, 21

Mengen (mg):

3,3

Volumen NaCl (ml)

1,0

Hase Nr. 4, 1 Punkt 2 mm

mm Hg 115

110

105

100

msec

250

240

230

220

mmHg 140

135

130

125

120

115

110

105

100

95

90

85

80

75

20

15

10

6

2

1

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

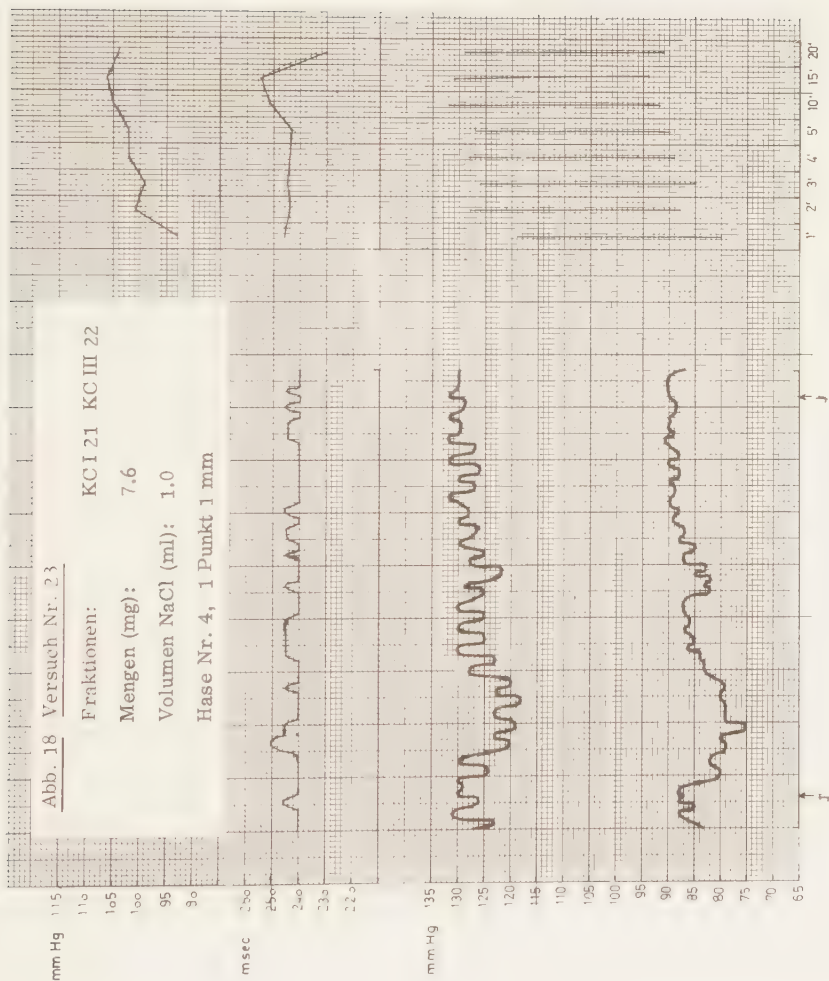
Abb. 18 Versuch Nr. 23

Fractionen: KC I 21 KC III 22

Mengen (mg): 7.6

Volumen NaCl (ml): 1.0

Hase Nr. 4, 1 Punkt 1 mm



Fraktionen: KC I 22, KC III 23

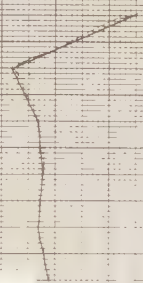
Mengen (mg) 6,0

Volumen NaCl (ml) 0,5

Hase Nr. 4, 1 Punkt 2 mm

mm Hg

90
85
80
75
70
65
60



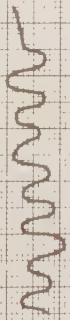
msec

280
260
240
220



mmHg

115
110
105
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50



15'

10'

4'

3'

2'

1'

0'

Abb. 20 Versuch Nr. 25

Fraktionen: KC I 23, KC III 24

Mengen (mg) 8,75

Volumen NaCl (ml): 0.5

Hase Nr. 4, 1 Punkt 2 mm

mm Hg

85

80

75

70

65

msec

290

280

270

260

250

240

230

mm Hg

115

110

105

100

95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

15'

10'

5'

4'

2'

1'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

Abb. 21 Versuch Nr. 26

Fractionen:

KC I 24, KC III 25

Mengen (mg):

7,47

Volumen NaCl (ml):

0,5

Hase Nr. 4, 1 Punkt 2 mm

mmHg

75
70
65
60

msec

280
270
260
250
240
230
220

mmHg

105
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40

15'

10'

5'

4'

3'

2'

1'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

0'

Abb. 22 Versuch Nr. 27

Fraktionen:

KC I 25 bis 27

KC III 26 bis 28

Mengen (mg):

18.29

Volumen NaCl (ml):

0.5

Hase Nr. 4, 1 Punkt 2mm

mm Hg 70

65

60

55

50

msec

360

340

320

300

280

260

240

220

mm Hg

95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

1' 2' 3' 4' 5' 10' 15' 45'

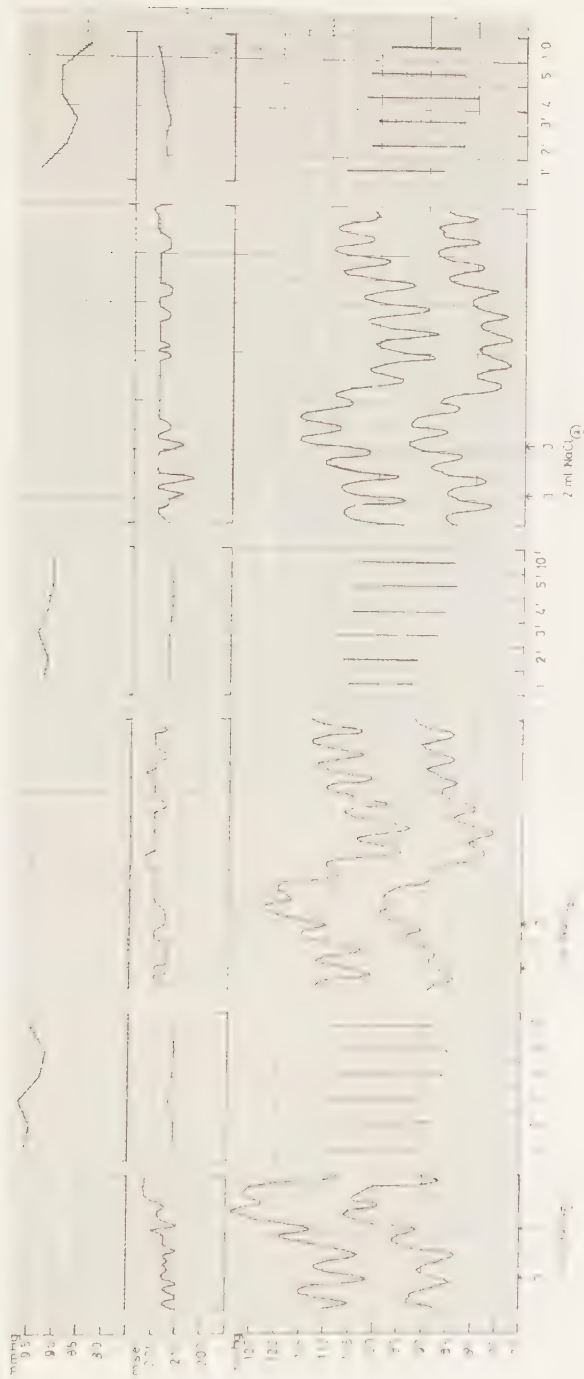


Abb 23a Kontrollversuch

Hase Nr. 11, 1 Punkt 1 mm

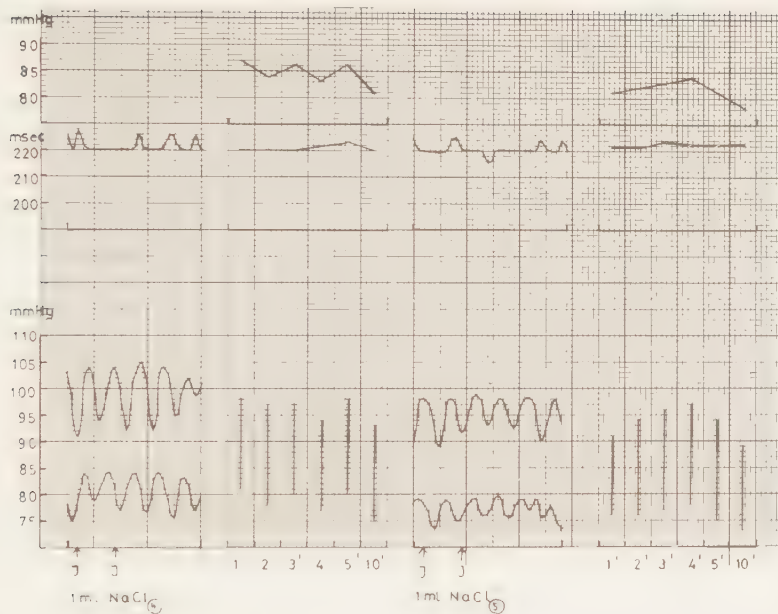
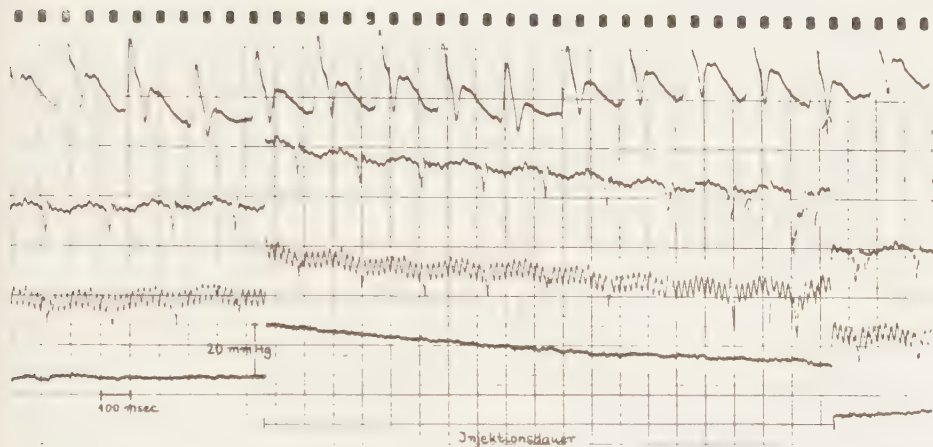


Abb. 23b Kontrollversuch

Hase Nr. 11, 1 Punkt 1 mm



Arterieller
Blutdruck
in der
A. carotis
comm.

3 EKG-Extre-
mitätenab-
leitungen



Abb. 24 Ausschnitt aus den Original-Aufzeichnungen der Tierversuche.

Abb. 24a bei Papiergeschwindigkeit 50 mm/sec.

Abb. 24b bei 100 mm/sec.

Lebenslauf

Als Sohn des Architekten Max Einhüpl und dessen Ehefrau Anna, geborene Maier wurde ich am 11.1.1947 in München geboren.

Im September 1953 trat ich in die Volksschule ein. 1957 wechselte ich an die Rupprecht-Oberrealschule über und absolvierte 1968 das Abitur am Nymphenburger-Gymnasium.

Im selben Jahr nahm ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München auf.

1970 legte ich das Vorphysikum ab, 1971 das Physikum.

Das Medizinstudium beendete ich im Juni 1974 mit dem Staatsexamen.

